





# **Die WHIRLY-Proteine von *Arabidopsis thaliana***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Rena Isemer**  
aus Lütjenburg

Kiel, 2013





Erste Gutachterin: Prof. Karin Krupinska

Zweiter Gutachter: Prof. Klaus Humbeck:

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2013

zum Druck genehmigt: 08.10.2013

Der Dekan



*Meiner Mutter Andrea*



## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1 Die Organellen der Pflanzenzelle und ihre Entstehung .....	6
1.2 Kommunikation zwischen den Organellen und dem Zellkern .....	7
1.2.1 Plastidäre retrograde Signale .....	8
1.2.2 Die <i>gun</i> -Mutanten .....	8
1.3 Dual lokalisierte Proteine in Pflanzen .....	10
1.4 Die Familie der WHIRLY-Proteine .....	13
1.4.1 Aufbau und Struktur von WHIRLY-Proteinen.....	13
1.4.2 Die Lokalisation der WHIRLY-Proteine in der Zelle .....	14
1.4.3 Funktionen von WHIRLY-Proteinen.....	17
1.4.3.1 Funktionen im Zellkern .....	17
1.4.3.2 Funktionen in den Organellen.....	19
1.4.3.3 Phänotypen von <i>WHIRLY</i> -Mutanten.....	21
1.5 Zielsetzung .....	24
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.1 Chemikalien und Enzyme .....	25
2.2 Pflanzenmaterial.....	25
2.2.1 Anzucht verschiedener Genotypen von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
2.2.2 Untersuchungen zur Keimung von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
2.2.3 Anzucht verschiedener Genotypen von <i>Nicotiana tabacum</i> .....	28
2.3 Bestimmung der maximalen Effizienz des Photosystems II.....	28
2.4 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	29
2.4.1 Lösungen und Puffer .....	29
2.4.2 Medien.....	29
2.4.3 Techniken zur Transformation von Bakterien .....	30
2.4.3.1 Bakterienstämme.....	30
2.4.3.2 Anzucht von Bakterienkulturen .....	30
2.4.3.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Flüssigkulturen von <i>Escherichia coli</i> .....	30
2.4.3.4 Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen .....	31
2.4.3.5 Erstellung von GFP- und RFP-Konstrukten mit dem Gateway® System.....	31
2.4.3.6 Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	32
2.4.4 Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	32
2.4.5 Isolierung von DNA aus Pflanzen .....	33
2.4.6 Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	34
2.4.7 Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	34
2.4.8 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese .....	34
2.4.9 Vervielfältigung von DNA-Fragmenten mittels PCR.....	35
2.4.10 Quantitative <i>Real-Time</i> PCR .....	36
2.4.10.1 Synthese von cDNA.....	36
2.4.10.2 <i>Real-Time</i> Polymerasekettenreaktion.....	36
2.4.11 Methoden zum Nachweis von DNA-Fragmenten.....	38
2.4.11.1 Kapillartransfer von DNA auf Membranen (Southern Blot) .....	39
2.4.11.2 DNA-Sonde für das <i>rps12</i> -Gen.....	39

2.4.11.3	Hybridisierung von DNA mit radioaktiv markierten Sonden .....	39
2.4.12	Isolierung und Aufreinigung von RNA.....	40
2.4.12.1	Isolierung von RNA aus Organen von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	40
2.4.12.2	Isolierung von RNA aus <i>Nicotiana tabacum</i> .....	40
2.4.13	5`RLM-RACE.....	41
2.4.14	Konfokale <i>Laserscanning</i> Mikroskopie .....	42
2.5	Allgemeine proteinbiochemische Analysen .....	43
2.5.1	Isolierung von Gesamtprotein aus Pflanzenmaterial.....	43
2.5.2	Methoden zur Isolierung und Fraktionierung von Chloroplasten.....	43
2.5.2.1	Chloroplastenisolierung aus Blattmaterial von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	43
2.5.2.2	Chloroplastenisolierung aus Blättern von <i>Nicotiana tabacum</i> .....	45
2.5.2.3	Fraktionierung von Chloroplasten.....	45
2.5.3	Anreicherung von Mitochondrien aus Blättern von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	46
2.5.4	Isolierung von Zellkernen aus Blättern von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	47
2.5.5	Isolierung von Zellkernen aus Blättern von <i>Nicotiana tabacum</i> .....	47
2.5.6	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	48
2.5.7	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	48
2.5.8	Färbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen mit Coomassie- Brillantblau.....	49
2.5.9	Methoden zur Immundetektion von Proteinen .....	50
2.5.9.1	Proteintransfer auf Trägermembranen (Western Blot).....	50
2.5.9.2	Liste der verwendeten Antikörper .....	50
2.5.9.3	Immundetektion .....	51
2.5.9.4	Entfernen von gebundenem Antikörper von der Trägermembran.....	51
2.5.9.5	Aufreinigung und Analyse des WHIRLY3-Peptidantikörpers .....	51
2.5.10	Koimmunpräzipitation .....	52
2.5.10.1	Isolierung von Chloroplastenproteinen .....	52
2.5.10.2	Durchführung einer Koimmunpräzipitation.....	54
2.6	Hefe-2-Hybridsystem.....	55
2.6.1	Hefestämme .....	56
2.6.2	Anzucht von Hefen .....	57
2.6.3	Klonierung von Konstrukten in die Vektoren pGBKT7 und pGAD424 .....	57
2.6.4	Transformation von Hefen .....	60
2.6.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen.....	61
2.6.6	Erstellung und Durchmusterung einer cDNA-Bank.....	61
2.6.7	X-Gal-Assay .....	63
2.7	Datenbanken und Internetseiten.....	63
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
3.1	Subzelluläre Lokalisation der WHIRLY-Proteine von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	64
3.1.1	Subzelluläre Lokalisierung von WHIRLY1 .....	64
3.1.2	Ermittlung der Längen von WHIRLY-Transkripten mittels RLM-RACE.....	65
3.1.3	Untersuchungen zum Mechanismus der Umverteilung von WHIRLY1 an Plastomtransformanten.....	67
3.1.4	Subzelluläre Lokalisierung von WHIRLY-Fusionsproteinen.....	71
3.1.5	Herstellung und Charakterisierung eines Antikörpers gegen WHIRLY3 .....	76
3.1.6	Immunologische Untersuchungen zur Lokalisierung von WHIRLY3.....	79
3.2	Identifizierung von Interaktionspartnern des WHIRLY3-Proteins .....	82
3.2.1	Hefe-2-Hybridsystem .....	82
3.2.2	Koimmunpräzipitation .....	83
3.3	Untersuchungen zur Funktion der WHIRLY-Proteine von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	87

3.3.1	Expression von <i>WHIRLY</i> -Genen .....	87
3.3.1.1	Transkriptmengen in verschiedenen Organen .....	87
3.3.1.2	Transkriptmengen in Blättern verschiedener Entwicklungsstadien .....	89
3.3.2	Untersuchungen an Mutanten und Überexpressionslinien .....	92
3.3.2.1	Molekulare Charakterisierung der <i>WHIRLY1</i> -T-DNA-Insertionsmutanten ...	92
3.3.2.2	Molekulare Charakterisierung von <i>WHIRLY1</i> -Überexpressionslinien .....	94
3.3.2.3	Phänotyp der Mutanten und <i>WHIRLY1</i> -Überexpressionslinien .....	96
3.3.3	Bedeutung der <i>WHIRLY</i> -Proteine für den Einfluss von Phytohormonen auf die Keimung von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	98
3.3.3.1	Einfluss von Salicylsäure und Abscisinsäure auf die Keimung von <i>why1</i> -Mutanten .....	98
3.3.3.2	Einfluss von Abamin auf die Hemmung der Keimung durch Salicylsäure...	100
3.3.3.3	Einfluss von Abscisinsäure und Salicylsäure auf die Keimung von <i>gun</i> -Mutanten .....	101
3.3.3.4	Einfluss von Abscisinsäure auf die Keimung von <i>WHIRLY1</i> -Überexpressionslinien .....	102
3.3.3.5	Einfluss von Abamin auf die Hemmung der Keimung durch Abscisinsäure .....	103
3.3.3.6	Einfluss von Abscisinsäure und Salicylsäure auf die Keimung von <i>WHIRLY</i> -Mutanten .....	104
3.3.4	Untersuchungen zur Funktion von <i>WHIRLY1</i> bei der Übertragung retrograder Plastidensignale .....	106
3.3.4.1	Untersuchungen an <i>WHIRLY1</i> -Mutanten .....	106
3.3.4.2	Untersuchungen an <i>WHIRLY1</i> -Überexpressionslinien .....	108
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>110</b>
4.1	Lokalisation der <i>WHIRLY</i> -Proteine von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	110
4.1.1	Subzelluläre Lokalisation von <i>WHIRLY1</i> .....	110
4.1.2	Die Umverteilung von <i>WHIRLY1</i> aus Plastiden in den Zellkern .....	111
4.1.3	Subzelluläre Lokalisation von <i>WHIRLY3</i> .....	114
4.2	Interaktionspartner des <i>WHIRLY3</i> -Proteins von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	116
4.3	Funktionen der <i>WHIRLY</i> -Proteine von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	119
4.3.1	Expression von <i>WHIRLY</i> -Genen .....	119
4.3.2	Phänotyp der <i>WHIRLY</i> -Mutanten .....	120
4.3.3	Einfluss der <i>WHIRLY</i> -Proteine auf die Wahrnehmung von Salicylsäure und Abscisinsäure während der Keimung .....	121
4.3.4	Die Beteiligung von <i>WHIRLY1</i> an der Kommunikation zwischen Plastiden und dem Zellkern .....	125
4.4	Ausblick .....	127
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>129</b>
<b>5.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>131</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>132</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>142</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>154</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>155</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
ABI	ABA-INSENSITIVE
ad	addieren zu
APS	Ammoniumpersulfat
$\alpha$ -WHIRLY3	aufgereinigter Peptidantikörper gegen das WHIRLY3-Protein
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Lumineszenz ( <i>enhanced chemiluminescence</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
<i>gun</i>	<i>genomes uncoupled</i>
HA	Hämagglutinin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
kDa	Kilodalton
LB	Nährmedium nach Luria Bertani
LHC	Lichtsammelkomplex ( <i>light harvesting complex</i> )
LN	Lincomycin
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MS	Murashige und Skoog Medium
mtDNA	mitochondriale DNA
NF	Norflurazon
PA	Polyacrylamid
p.a.	<i>pro analysis</i> , für Analysen geeignet
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pIDNA	plastidäre DNA
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	<i>pathogenesis related</i>
PS	Photosystem
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
SA	Salicylsäure
SAG	seneszenzassoziiertes Gen
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAC	Transkriptionsaktives Chromosom der Plastiden ( <i>transcriptionally active chromosome</i> )
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
T-DNA	transferierte DNA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIC	<i>translocon at the inner chloroplast membrane</i>
TILLING	<i>target induced local lesions in genomes</i>



TOC	<i>translocon at the outer chloroplast membrane</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Units</i>
ÜN	über Nacht
v/v	Volumenprozent
Vol.	Volumen
w/v	Gewichtsprozent

Proteine:

GFP	grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GUN	<i>genomes uncoupled</i>
PPR	<i>pentatricopeptid-repeat</i>
RFP	rot fluoreszierendes Protein ( <i>red fluorescent protein</i> )
RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
WHY	WHIRLY
YFP	gelb fluoreszierendes Protein ( <i>yellow fluorescent protein</i> )

### 1. Einleitung

Eukaryoten unterscheiden sich von ihren prokaryotischen Verwandten durch die Unterteilung ihrer Zellen in Kompartimente. Ein Kompartiment wird definiert als die Gesamtheit aller membranumschlossenen Reaktionsräume eines Typs. Hierzu gehört auch der Zellkern, der als typisches Merkmal einer eukaryotischen Zelle gilt. Die Kompartimentierung dient der Kontrolle und Optimierung biochemischer Abläufe und findet sich bei den meisten vielzelligen Organismen.

#### 1.1 Die Organellen der Pflanzenzelle und ihre Entstehung

Eine besondere Form der Kompartimente sind die Organellen, zu denen die Mitochondrien und die Plastiden der Pflanzenzellen zählen. Sie sind prokaryotischer Herkunft und enthalten ringförmige DNA und 70S-Ribosomen. Plastiden existieren in höheren Pflanzen in verschiedenen Erscheinungsformen, die sich teilweise ineinander umwandeln können. Die bekannteste Form der Plastiden sind die Chloroplasten. Sie sind die Orte der Photosynthese und produzieren den Großteil der Nahrungsmittel und Biomasse auf unserem Planeten. Neben der Fixierung von Kohlenstoff sind Plastiden auch Syntheseort für viele wichtige Stoffe, wie zum Beispiel Carotinoide, Tetrapyrrole oder Phytohormone. Zusammen mit den Mitochondrien synthetisieren sie ATP und liefern somit die biochemische Energie für alle zellulären Abläufe.

Beide Organellen besitzen im Unterschied zu anderen Kompartimenten eine doppelte Hüllmembran sowie eine Elektronentransportkette. Weiterhin ähnelt die Organisation der ringförmigen DNA der Plastiden und Mitochondrien der von Prokaryoten. Die Zellen höherer Pflanzen beinhalten viele Kopien des plastidären Genoms (2000 bis 50000 Kopien pro Zelle), wobei die Anzahl vom Gewebe und Zelltyp abhängig ist (Kuroiwa et al., 1982; Krupinska et al., 2012). Die plastidäre DNA (pIDNA) bildet zusammen mit Proteinen und RNA eine hochmolekulare Struktur, die innerhalb der Plastiden an Membranen angelagert ist. Diese Struktur, die als plastidäres Nukleoid bezeichnet wird, ist für die Reparatur und Replikation von DNA, die Rekombination, Transkription und die post-transkriptionelle Kontrolle der plastidären Genexpression zuständig (Kuroiwa, 1991; Sakai et al., 2004; Krupinska et al., 2012; Pfalz und Pfannschmidt, 2013). Nukleotide können aus Plastiden aufgereinigt werden und werden in Anbetracht ihrer Transkriptionsaktivität auch als TAC (*transcriptionally active chromosome*) bezeichnet (Krupinska et al., 2012; Pfalz und Pfannschmidt, 2013).

Laut der Endosymbiontentheorie entwickelten sich Plastiden im Zuge eines endosymbiotischen Prozesses, der vor mehr als 1,2 Milliarden Jahren begann, als eine eukaryotische Wirtszelle einen photosynthetischen Prokaryoten, wahrscheinlich einen Verwandten der heutigen Cyanobakterien, aufnahm (Mereschkowsky, 1905; Goksøyr, 1967). Mitochondrien entstanden auf ähnliche Weise bereits vor etwa 2 Milliarden Jahren aus  $\alpha$ -Proteobakterien (Gray et al., 1999; Gogarten et al., 2002).

Im Laufe der Zeit wurden der aufgenommene Prokaryot und die Wirtszelle immer mehr zu einer Einheit. Dabei kam es durch einen permanenten und sukzessiven Fluss von genetischem Material aus dem prokaryotischen Endosymbionten in den Zellkern der Wirtszelle zu einem fast vollständigen Transfer der Organellengene in die eukaryotische DNA (Martin et al., 2002; Timmis et al., 2004). Plastidäre Genome enthalten heute nur noch 20 bis 200 Gene und mitochondriale Genome kodieren sogar für nur drei bis 67 Proteine (Gray et al., 1999; Timmis et al., 2004). Chloroplasten der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*, Ackerschmalwand, L.) enthalten etwa 2000 verschiedene Proteine, von denen nur noch 87 direkt im Organell kodiert sind (Baerenfaller et al., 2008; Zybailov et al., 2008; Martin et al., 2002). Die plastidären Gene kodieren größtenteils für Komponenten des Photosyntheseapparates sowie für die plastidäre Transkriptions- und Translationsmaschinerie (Sugiura, 1992). Die Mehrheit der Organellenproteine wird hingegen von Genen im Zellkern kodiert und im Cytoplasma an 80S-Ribosomen als Vorstufenproteine synthetisiert. Vorstufenproteine liegen ungefaltet vor und gelangen mit Hilfe eines Proteinabschnittes am N-Terminus des Proteins, der als Importsequenz bezeichnet wird, in die Organellen. Die Importsequenz wird von Proteinkomplexen in den Hüllmembranen der beiden Organellen, den sogenannten Importapparaten erkannt. Das Protein wird mit Hilfe der Importapparate importiert und die Importsequenz wird anschließend proteolytisch entfernt. Jetzt kann das prozessierte Protein seine letztendliche Konformation annehmen (Jarvis und Soll, 2002; Gabriel und Pfanner, 2007; Flores-Pérez und Jarvis, 2013). Folglich sind prozessierte Proteine in den Organellen kleiner als ihre Vorstufenproteine. Die Komplexe der plastidären Importapparate werden als TIC bzw. TOC (*translocon at the inner/outer chloroplast membrane*) bezeichnet.

### 1.2 Kommunikation zwischen den Organellen und dem Zellkern

Der größte Teil der Organellenproteine wird, wie bereits erläutert, im Kerngenom kodiert. Indem der Zellkern die Synthese der kernkodierten Organellenproteine verändert sendet er Signale an die Plastiden und Mitochondrien und kontrolliert diese. Die Signale, die vom Zellkern an die Organellen gesendet werden, bezeichnet man als anterograde Signale (Woodson und Chory, 2008). Die Transkriptionsaktivitäten des Zellkerns müssen auf den physiologischen Zustand und die Genexpression der Organellen angepasst sein. Um dies zu gewährleisten, senden Mitochondrien und Plastiden sogenannte retrograde Signale an den Zellkern (Beck, 2005; Woodson und Chory, 2008; Krupinska, 2011; Duchêne und Giegé, 2012). Zwischen dem Zellkern und den Organellen werden ständig anterograde und retrograde Signale ausgetauscht, welche die Kommunikation zwischen dem Zellkern und den Organellen ermöglichen und essentiell für die Anpassung an veränderte Umweltbedingungen und Stresssituationen sind (Abb. 1A). In photosynthetischen Eukaryoten werden zusätzlich Signale zwischen den Mitochondrien und den Plastiden ausgetauscht (Woodson und Chory, 2008).

### 1.2.1 Plastidäre retrograde Signale

An den weißen Blattbereichen der Gerstenmutante *albostrians* wurde erstmals beobachtet, dass Plastiden retrograde Signale zum Zellkern senden. Die weißen Blattbereiche bilden sich auf Grund von defekten 70S-Ribosomen in den Plastiden. Die Menge der kleinen Untereinheit der RuBisCo (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase), welche im Zellkern durch das *RBCS*-Gen kodiert ist, ist in den weißen Bereichen verringert, obwohl die 80S-Ribosomen im Cytoplasma intakt sind (Bradbeer et al., 1979). Folglich scheint die Störung der plastidären Genexpression die Transkription des *RBCS*-Gens im Zellkern zu beeinflussen. Spätere Studien, bei denen selektiv die 70S-Ribosomen mit geeigneten Antibiotika wie Lincomycin gehemmt wurden, konnten diese Beobachtung bestätigen (Oelmüller et al., 1986; Gray et al., 1995; Yoshida et al., 1998; Sullivan und Gray, 1999). In allen Untersuchungen war die Expression des *RBCS*-Gens und/oder eines *LHCB*-Gens, welches im Zellkern für ein Protein des Lichtsammelkomplexes des Photosystems II kodiert (*LHCII*, *light harvesting complex II*), herunter reguliert. Die Transkriptmenge von *RBCS* und *LHCB* wird daher als Marker für die Wirkung von plastidären retrograden Signalen auf die Genexpression im Zellkern verwendet.

Neben der Genexpression gibt es noch weitere Prozesse in den Plastiden, die als Auslöser retrograder Signale diskutiert werden. Dazu zählen die Tetrapyrrolbiosynthese (Beck, 2001; Papenbrock und Grimm, 2011), die Bildung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), insbesondere Singulett-sauerstoff und Wasserstoffperoxid (Mullineaux und Karpinski, 2002; Apel und Hirt, 2004), die photosynthetische Elektronentransportkette (Pfannschmidt et al., 2003; Leister, 2012) und die Synthese von PAP (3-Phosphoadenosine 5-Phosphat) (Estavillo et al., 2011). Auch das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) wird als Auslöser plastidärer retrograder Signale diskutiert (Koussevitzky et al., 2007; Voigt et al., 2010). ABA wird nahezu vollständig in den Chloroplasten synthetisiert. Aus Carotinoiden entsteht mit Hilfe des Enzyms NCED (9-Cis-Epoxycarotinoid-Dioxygenase) in den Plastiden zunächst Xanthoxin, welches ins Cytoplasma transportiert und dort zu ABA umgesetzt wird (Cutler et al., 2010; Seo und Koshiba, 2011). Da die Abscisinsäure nicht innerhalb der Plastiden lokalisiert ist, könnte sie Informationen an den Zellkern weiter geben. Die verschiedenen Auslöser retrograder Plastidensignale wurden durch genetische und physiologische Studien bekannt. Dabei hat besonders die Entdeckung der *gun*-Mutanten eine entscheidende Rolle gespielt (Susek et al., 1993).

### 1.2.2 Die *gun*-Mutanten

Eine Störung in der Chloroplastenentwicklung bewirkt, dass die Transkriptmenge des *LHCB*-Gens im Zellkern sinkt (Oelmüller und Mohr, 1986) (Abb. 1A). Die gestörten Plastiden senden ein retrogrades Signal an den Zellkern und beeinflussen so dessen Aktivität. In einer mutierten Population von *A. thaliana* wurde nach Mutanten gesucht,

die bei einer funktionellen Störung der Chloroplasten keine verringerte *LHCB*-Transkriptmenge zeigten. Die funktionelle Störung der Chloroplasten wurde durch Norflurazon (NF) induziert. NF inhibiert das Enzym Phytoene-Desaturase in den Chloroplasten, wodurch die Carotinoidbiosynthese blockiert wird (Sandmann und Böger, 1989). Die fehlenden Carotinoide führen zur funktionellen Störung der Chloroplastenbiosynthese. Es wurden fünf Mutanten identifiziert, in denen die *LHCB*-Transkriptmenge von der durch NF hervorgerufenen funktionellen Störung der Plastiden nicht beeinflusst wird, also "entkoppelt" ist (Susek et al., 1993) (Abb. 1B). Diese sogenannten *gun*-Mutanten (*genomes uncoupled*, *gun1* bis *gun5*) besitzen folglich einen Defekt in einem Protein, das an der Übertragung des Plastidensignals beteiligt ist.

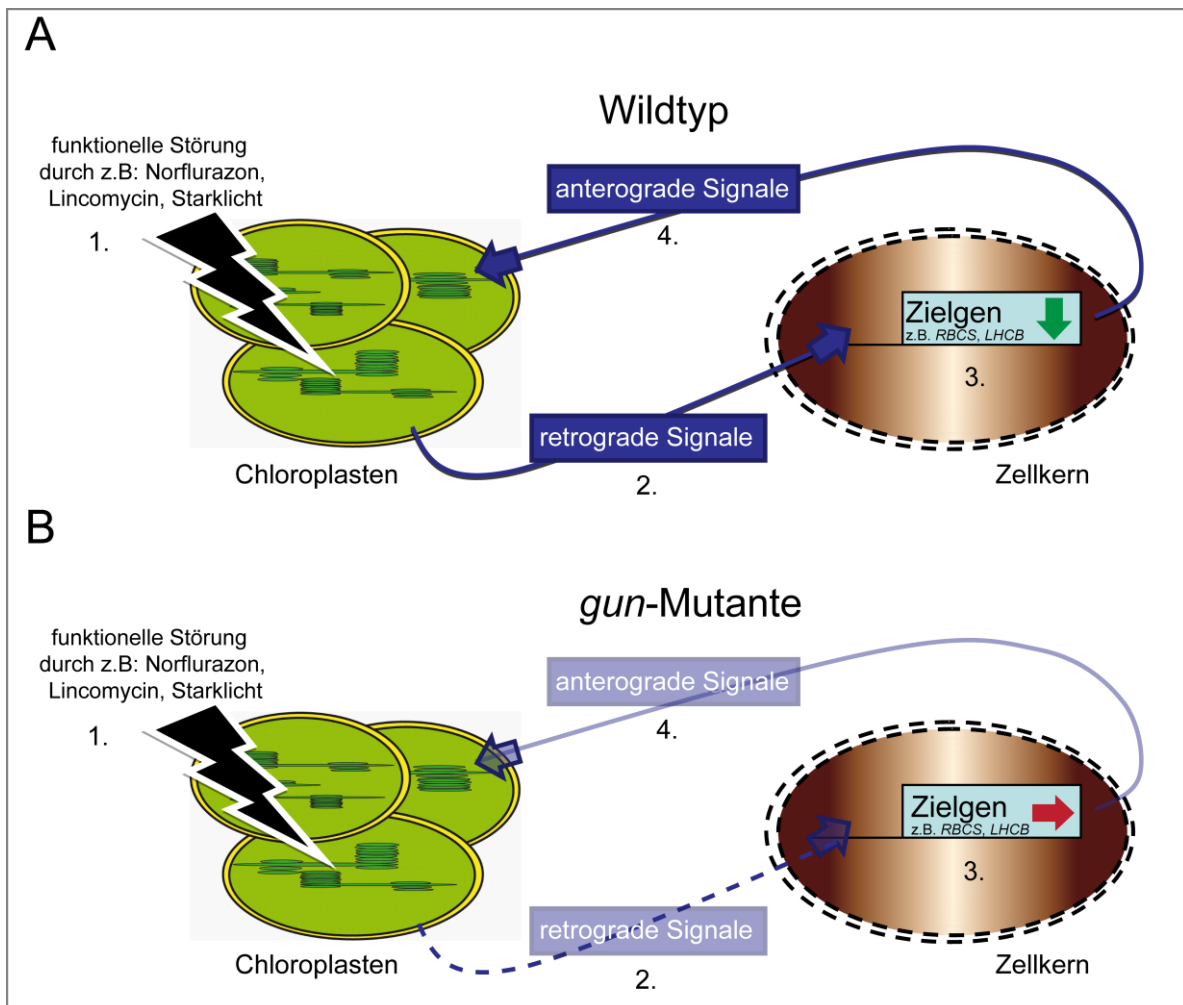


Abb. 1: Kommunikation zwischen den Chloroplasten und dem Zellkern. **A** Im Wildtyp senden Chloroplasten nach einer funktionellen Störung (1.) retrograde Signale (2.) an den Zellkern. Die Expression von Zielgenen wie *RBCS* und *LHCB* wird reduziert (3.) und der Zellkern kann mittels anterograder Signale (4.) auf die Stresssituation reagieren. **B** In einer *gun*-Mutante (*genomes uncoupled*) ist die Übertragung des Plastidensignals gestört (2.) und die Expression der Zielgene verändert sich nicht (3.).

Die genetischen Defekte in den Mutanten *gun2* bis *gun5* konnten alle dem Tetrapyrrolsyntheseweg zugeordnet werden. Die *gun2*-Mutante ist in der Hämoxygenase

gestört, während die *gun3*-Mutante einen Defekt in der Phytochromobilin-Synthase hat (Surpin et al., 2002). In der *gun4*-Mutante liegt eine Schädigung eines Aktivators der Mg-Chelatase vor und die *gun5*-Mutation betrifft die Untereinheit H des Enzyms Mg-Chelatase selbst (Strand, 2004). All diese Defekte führen letztendlich zu einer verringerten Menge an Mg-Protoporphyrin IX, welches eine zentrale Rolle bei der Übertragung plastidärer Signale spielt (Woodson und Chory, 2008). Wie genau das Mg-Protoporphyrin IX-Signal zum Zellkern gelangt, ist bisher ungeklärt.

Der Defekt in der *gun1*-Mutante konnte auf ein PPR-Protein (*pentatricopeptid-repeat*) zurückgeführt werden (Surpin et al., 2002; Koussevitzky et al., 2007). PPR-Proteine haben ihren Namen von einer 35 Aminosäuren langen Sequenz, die in den Proteinen mehrfach vorkommt und tandemartig angeordnet ist (Small und Peeters, 2000; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Diese große Proteinfamilie findet man in fast allen Eukaryoten, wo die meisten der bis jetzt untersuchten PPR-Proteine in Organellen zu finden sind (Saha et al., 2007; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Das PPR-Protein GUN1 ist in den Plastiden lokalisiert und bindet dort an DNA. Obwohl der Wirkmechanismus von GUN1 ungeklärt ist, ist unbestritten, dass GUN1 eine zentrale Rolle bei der Übertragung verschiedener retrograder Plastidensignale spielt. GUN1 überträgt sowohl Informationen über den funktionellen Zustand der plastidären Genexpression (Gray et al., 2003) und des Redoxstatus der Plastiden (Koussevitzky et al., 2007) als auch Plastidensignale, die durch ABA und Zucker ausgelöst werden (Koussevitzky et al., 2007; Cottage et al. 2010), an den Zellkern. Neben den fünf klassischen *gun*-Mutanten wurden weitere *gun*-Mutanten identifiziert, wie zum Beispiel die *ptm*-Mutante (Sun et al., 2011) oder die *cry1*-Mutante (Ruckle et al., 2007; Ruckle und Larkin, 2009).

Man weiß bereits viel über die Auslöser von Plastidensignalen, und auch die Auswirkungen auf den Zellkern sind gut erforscht. Unklar ist jedoch, wie das retrograde Signal die Chloroplastenhüllmembran und die Kernmembran passiert. Vorangegangene Arbeiten postulierten einen mobilen "Plastidenfaktor", der die Plastiden verlassen kann (Oelmüller und Mohr, 1986). Hierfür wären Proteine, die sowohl im Zellkern als auch in den Plastiden zu finden sind, und somit zu den dual lokalisierten Proteinen zählen, ideale Kandidaten.

### 1.3 Dual lokalisierte Proteine in Pflanzen

Proteine, die von einem Gen kodiert werden, jedoch an zwei Orten in der Zelle akkumulieren, bezeichnet man als dual lokalisierte Isoformen (Krause und Krupinska, 2009; Yogev und Pines, 2011; Burak et al., 2013). Die Isoformen können unterschiedliche Funktionen in den jeweiligen Kompartimenten haben (Silva-Filho, 2003). Durch die Aminosäuresequenz eines Proteins wird festgelegt, wohin ein neu synthetisiertes Protein in der Zelle transportiert wird. Damit Proteinprodukte, die aus einem Gen entstanden sind, in zwei verschiedenen Kompartimenten der Zelle akkumulieren können, gibt es verschiedene Mechanismen. Viele Proteine, die sowohl in Mito-

chondrien als auch in den Plastiden akkumulieren, besitzen eine N-terminale Importsequenz, die von den Importapparaten beider Organellen erkannt wird. Andere Proteine besitzen mehrere Signale für verschiedene Kompartimente. Beispielsweise kann eine N-terminale Importsequenz für die Mitochondrien zusammen mit einem C-terminalen Signal für die Peroxisomen vorkommen (Small et al., 1998; Yogev und Pines, 2011; Duchêne und Giegé, 2012). Damit solche Proteine zur richtigen Zeit im richtigen Kompartiment akkumulieren, werden regulatorische Mechanismen wie alternative Transkriptions- und Translationsstartstellen, alternatives Spleißen und post-translationale Veränderungen der Proteine benötigt (Silva-Filho, 2003; Krause und Krupinska, 2009; Duchêne und Giegé, 2012). Neben den Proteinen, die direkt nach ihrer *de novo* Synthese in zwei verschiedene Kompartimente transportiert werden, gibt es auch dual lokalisierte Proteine, die zunächst in einem Kompartiment akkumulieren, von dem sie in ein zweites Kompartiment umverteilt werden. Zum Beispiel akkumuliert das CAH1-Protein von *A. thaliana* zunächst im ER, von wo aus es nach post-translationalen Modifikationen in die Plastiden gelangt (Burén et al., 2011).

Das erste dual lokalisierte Protein, das in Pflanzenzellen identifiziert wurde, war die Glutathion-Reduktase der Erbse (*Pisum sativum*), die gleichzeitig in Chloroplasten und Mitochondrien detektiert wurde (Creissen et al., 1995). Seit dieser Entdeckung wurden zahlreiche dual lokalisierte Proteine in Pflanzen beschrieben. Die Mehrheit von ihnen findet man in Plastiden und Mitochondrien (Carrie und Small, 2012). Ein Beispiel hierfür sind einige der Aminoacyl-tRNA-Transferasen von *A. thaliana* (Duchêne et al., 2005). Etwa ein Dutzend der dual lokalisierten Proteine in Pflanzen sind in Mitochondrien und Peroxisomen lokalisiert und es existieren sechs bekannte Proteine, die sowohl im Zellkern als auch den Mitochondrien zu finden sind (Yogev und Pines, 2011; Duchêne und Giegé, 2012). Ein Beispiel für letztere sind die zwei Isoformen der DNA-Ligase1 von *A. thaliana*, deren duale Lokalisation mittels GFP-Fusionsproteinen nachgewiesen wurde (Sunderland et al., 2006). Sowohl im Zellkern als auch in den Mitochondrien ist die Ligase wahrscheinlich in die letzten Schritte der DNA-Reparatur involviert (Taylor et al., 1998).

Eine weitere Gruppe der dual lokalisierten Proteine akkumuliert in Plastiden und dem Zellkern (Krause et al., 2009; Krause et al., 2012; Krupinska et al., 2012) (Tab. 1). Das Enzym DHFR (Dihydrofolate-Reduktase-Thymidylate-Synthase), welches den letzten Schritt bei der Synthese von Tetrahydrofolat katalysiert, wurde als eines der ersten in Plastiden und dem Zellkern lokalisierten Proteine identifiziert. Ein alternativer Transkriptionsstartpunkt führt zur dualen Lokalisation der DHFR (Luo et al., 1997). Ähnlich funktioniert die duale Lokalisation des NtWin4-Proteins. Ein alternativer Startpunkt der Translation führt zur Synthese eines 26 kDa großen Proteins, das im Zellkern akkumuliert, und eines 24 kDa großen Vorstufenproteins. Letzteres wird in die Plastiden importiert und zu einer 17 kDa großen Isoform prozessiert (Kodama und Sano, 2007).

## 1. Einleitung

Tab. 1: Proteine mit einer Lokalisation in Plastiden und dem Zellkern. Die duale Lokalisation wurde zumeist mit GFP-Fusionsproteinen gezeigt (gfp). In einigen Fällen wurden Western Blot Analysen (blot), Immunfluoreszenz (fluo), Immunogoldmarkierungen (gold) oder Enzymassays (act) durchgeführt.

Protein	Methode	Funktion in Plastiden	Funktion im Zellkern	Literatur
WHIRLY1	P-gfp-blot- gold-fluo N-blot- gold-fluo	bindet an Nukleinsäuren; involviert in Spleißen und Erhaltung der DNA	Transkriptionsfaktor; bindet an Telomere	Grabowski et al., 2008; Isemer et al., 2012a
MFP1	P-gfp-gold N-gfp - gold-blot	an die Stromaseite der Thylakoide gebunden; Be- standteil des TAC	an dekondensierte DNA ge- bunden; bindet Chromatin an die Kernhülle	Samaniego et al., 2008; Meier et al., 1996
NRIP1	P-gfp N-gfp	in uninfizierten Pflanzen im Stroma lokalisiert; in Stromuli nachweisbar	Lokalisierung ins Cytosol und in den Zellkern nach Infektion; aktiviert die Immunantwort	Caplan et al., 2008
HEMERA/ pTAC12/ PAP5	P-gfp-blot N-gfp-blot	Bestandteil des TAC	Phytochromsignale; wird in <i>phytochrome nuclear bodies</i> protolysiert	Pfalz et al., 2006; Chen et al., 2010
SEBF	P-blot N-blot	unbekannt; Sequenzähnlich- keit zu RNA-Bindeproteinen	Repressor des <i>PR10a</i> -Gens der Kartoffel	Boyle und Brisson, 2001
ATXR5	P-gfp N-gfp	unbekannt	interagiert mit PCNA; Zell- zyklus und DNA Replikation	Raynaud et al., 2006
DHFR	P-gold N-gold	Dihydrofolate-Reduktase- Thymidylate-Synthase	Dihydrofolate-Reduktase- Thymidylate-Synthase	Luo et al., 1997
STEP1, cp31	P-act N-gfp	RNA-Bindeprotein	bindet an Telomere und erhält deren Länge	Kwon und Chung, 2004
AtCDT1	P-gfp N-gfp	Teilung; interagiert mit ARC6	Replikation von DNA	Raynaud et al., 2005
LEM1	P-gfp N-gfp	Ähnlichkeit zum S9-Protein aus 30S-Ribosomen der Plastiden in Reis	unbekannt	Ma und Dooner, 2004
NtWin4	P-gfp-blot N-gfp	Induktion des hypersensiti- ven Zelltodes	Repressor der Transkription während der Pathogenantwort	Kodama und Sano, 2006
AtIPT3	P-gfp N-gfp	wird nicht farnesyliert; Biosynthese von Cytokinin	wird farnesyliert; Lokalisierung in den Zellkern reguliert die Biosynthese von Cytokinin	Galichet et al., 2008
SWIB-4	P-gfp-blot N-gfp-blot	unbekannt	Bestandteil des SWI/SNF <i>chromatin-remodeling</i> Kom- plexes	Melonek et al., 2012
PEND	P-gfp N-gfp	Anbindung der Nukleole an die Membran	unbekannt	Sato et al., 1998; Terasawa und Sato, 2009

Abkürzungen: AtIPT3, Adenosine Phosphate-Isopentenyltransferase 3; DHFR, Dihydrofolate Reduc-tase-Thymidylate Synthase; LEM1, *lethal embryo 1*; MAR, *matrix attachment region*; N, Zellkern; NRIP1, *N receptor-interacting protein*; NtWIN4, *N. tabacum wound-induced clone 4*; P, Plastiden; PCNA, *proliferating cell nuclear antigen*; SEBF, *silencing element binding factor*.

Ein weiteres Beispiel für ein dual lokalisiertes Protein, das in Plastiden und dem Zellkern vorkommt, ist WHIRLY1. Dieses Protein kommt gleichzeitig in beiden Kompartimenten einer Zelle vor, und beide Isoformen haben die gleiche molekulare Größe (Grabowski et al., 2008). Bisher wurden kaum Beispiele solcher dual lokalisierten Proteine beschrieben. Es wird spekuliert, dass WHIRLY1 zunächst im Organell gelagert wird und auf ein bestimmtes Signal hin im Zellkern akkumuliert (Krause und Krupinska, 2009). Bis jetzt konnte jedoch für kein Protein eine Umverteilung von den Plastiden in den Zellkern gezeigt werden. Sollte das WHIRLY1-Protein tatsächlich von einem Kompartiment ins andere gelangen können,



so wäre das Protein ein Kandidat für die Übertragung plastidärer retrograder Signale (Krause et al., 2012).

### 1.4 Die Familie der WHIRLY-Proteine

WHIRLY-Proteine gehören zu einer kleinen kernkodierten Proteinfamilie, die nur in Angiospermen vorkommt (Desveaux et al., 2004; Krause et al., 2005). Die meisten bisher untersuchten Pflanzenarten besitzen lediglich zwei WHIRLY-Proteine, die als WHIRLY1 und WHIRLY2 bezeichnet werden. Das WHIRLY3-Protein hingegen hat man bisher nur in der Westlichen Balsam-Pappel (*Populus trichocarpa*), der Sojabohne (*Glycine max*), Rübsen (*Brassica rapa*) und der Modellpflanze *A. thaliana* gefunden. Warum einige Spezies ein drittes WHIRLY-Protein besitzen, ist nicht bekannt.

#### 1.4.1 Aufbau und Struktur von WHIRLY-Proteinen

Die Proteine aus der WHIRLY-Familie sind in Bezug auf ihre molekulare Größe und ihren isoelektrischen Punkt kaum zu unterscheiden (Desveaux et al., 2004). Charakteristisch für WHIRLY-Proteine ist die sogenannte WHIRLY-Domäne, in welcher die Aminosäureabfolge Lys-Gly-Lys-Ala-Ala-Leu (KGKAAL) zu finden ist. Mittels dieser konservierten Aminosäuren sind die Proteine in der Lage, an einzelsträngige DNA zu binden (Desveaux et al., 2002). Einige WHIRLY-Proteine, unter anderem WHIRLY1 und WHIRLY3 von *A. thaliana*, besitzen an ihrem N-Terminus eine theoretische Autoregulationsdomäne, mit deren Hilfe Proteine in der Lage sind, ihre eigene Synthese zu regulieren (Desveaux et al., 2005; Grabowski, 2008). Ein weiteres gemeinsames Strukturmerkmal von WHIRLY-Proteinen ist eine theoretische Kupferbindedomäne, die man zum Beispiel bei AtWHIRLY3 von *A. thaliana* und HvWHIRLY1 von Gerste (*Hordeum vulgare*) findet (Vorhersage mit dem Programm Motif Scan; [http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)).

Das erste beschriebene WHIRLY-Protein wurde bei Untersuchungen an Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) entdeckt und wurde auf Grund seiner Größe von etwa 24 kDa zunächst als p24 bezeichnet (Després et al., 1995; Desveaux et al., 2000) (Abb. 2A). Röntgenkristallstrukturanalysen zeigten, dass sich vier p24-Untereinheiten zu einem Homotetramer zusammen lagern können, wobei die Interaktion der einzelnen Monomere miteinander über ein Helix-Loop-Helix-Motiv am C-Terminus erfolgt (Desveaux et al., 2000, 2002) (Abb. 2B). Jedes p24-Monomer in diesem Komplex kann an einzelsträngige DNA binden. Später wurde p24 auf Grund der charakteristischen Quartärstruktur des Homotetramers, welches wie ein Wirbel (engl. *whirly*) geformt ist, in WHIRLY1 umbenannt (Desveaux et al., 2002). Eine Tetramerisierung wird für alle WHIRLY-Proteine aus verschiedenen Spezies erwartet (Desveaux et al., 2004) und konnte für ein zweites WHIRLY-Protein der Kartoffel (StWHIRLY2) bereits

durch Röntgenkristallstrukturanalysen bestätigt werden (Cappadocia et al., 2008, 2010). Es ist jedoch nicht bekannt, ob verschiedene WHIRLY-Proteine auch Heterooligomere miteinander bilden können. Erst kürzlich wurde durch Röntgenkristallstrukturanalysen von StWHIRLY2 der Kartoffel gezeigt, dass WHIRLY-Proteine fähig sind, 24mere zu bilden, indem sich sechs Tetramere aneinander lagern (Cappadocia et al., 2012). Die 24mer-Struktur hat die Form einer hohlen Schale. Somit ähnelt sie Strukturen, wie dem menschlichen Ferretin, die dafür bekannt sind, Stoffe zu binden. Die Bildung von 24meren kann nur in Gegenwart von DNA erfolgen (Cappadocia et al., 2012).

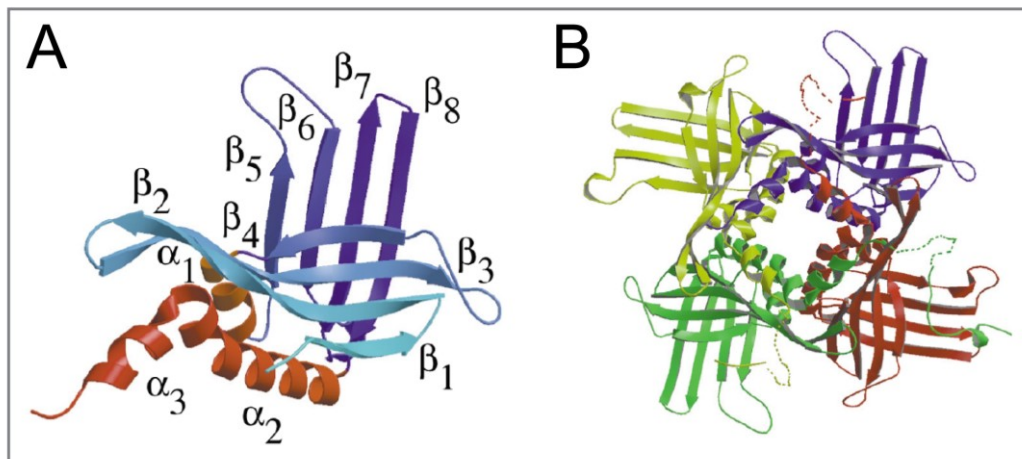


Abb. 2: Dreidimensionale Struktur des StWHIRLY1-Proteins der Kartoffel. **A** Bänderdiagramm des StWHIRLY1-Proteins. rot:  $\alpha$ -Helices; blau:  $\beta$ -Faltblätter **B** Tetramer aus vier StWHIRLY1-Proteinen (PBF2). Die Abbildungen sind der Arbeit von Desveaux et al. (2002) entnommen.

WHIRLY-Proteine wurden nur in höheren Pflanzen gefunden (Desveaux et al., 2004; Krause et al., 2005). In Grünalgen der Gattungen *Chlamydomonas* und *Ostreococcus* wurden Proteine nachgewiesen, die eine ähnliche Struktur, jedoch nur eine geringe Sequenzähnlichkeit zu den WHIRLY-Proteinen aufweisen. Ebenso konnte für das in die Zellteilung involvierte SsgB-Protein des Ascomyceten *Thermobifida fusca* und für die mitochondrialen RNA-Bindeproteine MRP1 und MRP2 aus dem Humanparasit *Trypanosoma brucei* eine strukturelle Ähnlichkeit zu den WHIRLY-Proteinen in Pflanzen gezeigt werden (Schumacher et al., 2006; Xu et al., 2009).

### 1.4.2 Die Lokalisation der WHIRLY-Proteine in der Zelle

Neben der WHIRLY-Domäne weisen WHIRLY-Proteine eine weitere gemeinsame Struktur in ihrer Aminosäuresequenz auf. Die meisten der untersuchten WHIRLY1- und WHIRLY3-Proteine besitzen eine Importsequenz für die Plastiden. WHIRLY1 wurde ursprünglich als Transkriptionsfaktor im Zellkern beschrieben (Després et al., 1995; Desveaux et al., 2000, 2002, 2004) und gehört also zu den bereits beschriebenen dual lokalisierten Proteinen (1.3). Ein Großteil aller WHIRLY2-Proteine sind

durch ihre Importsequenz in der Lage, in den Mitochondrien zu akkumulieren (Krause et al., 2005) (Abb. 3).

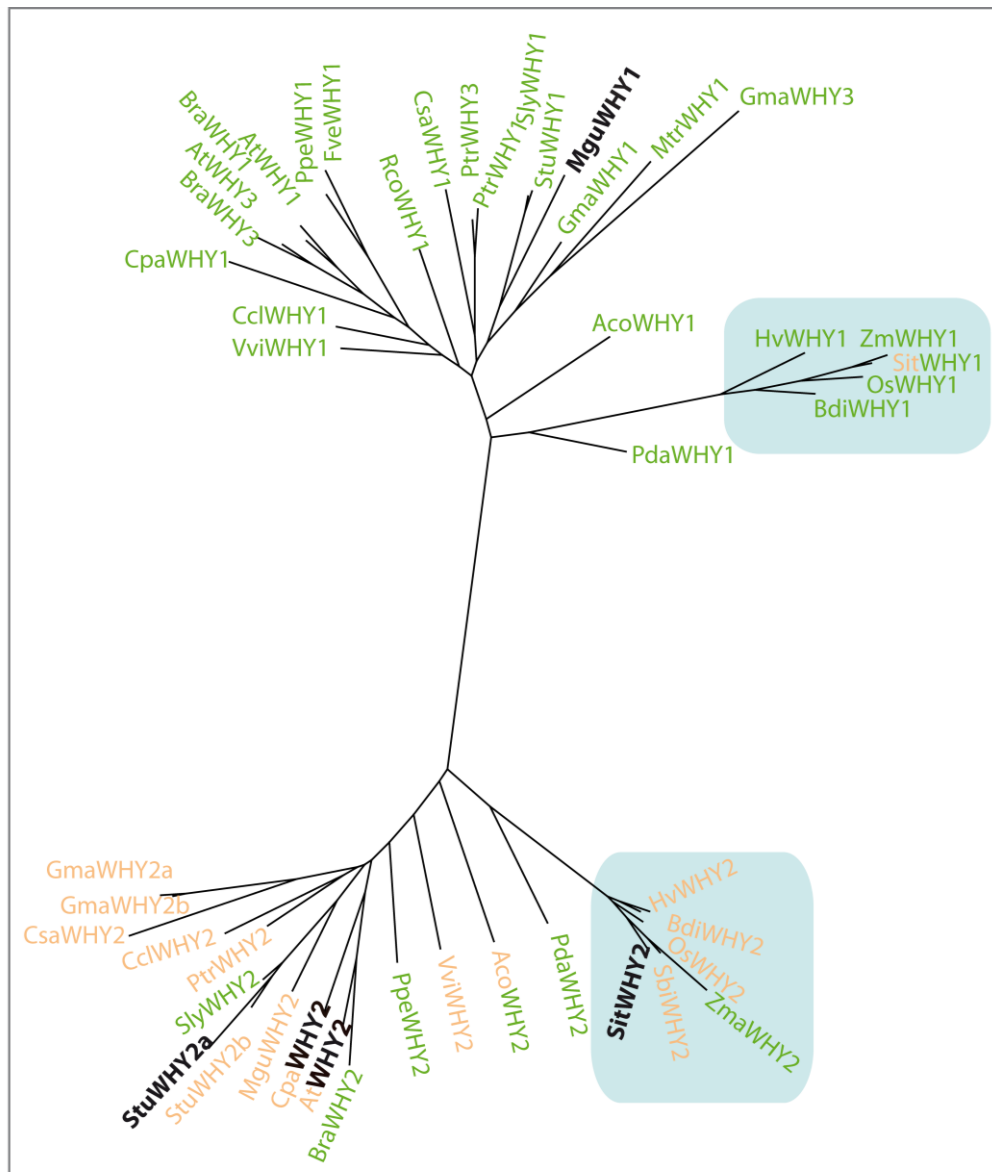


Abb. 3: Phylogenetischer Stammbaum aller bekannten WHIRLY-Proteine (NCBI Datenbank). WHIRLY1-Proteine und die in einigen Spezies gefundenen WHIRLY3-Proteine bilden eine Gruppe, deren Vertreter meist eine theoretische Lokalisation in den Plastiden haben (grün). Eine zweite Gruppe wird ausschließlich von WHIRLY2-Proteinen gebildet, welche zumeist eine theoretische Lokalisation in den Mitochondrien haben (orange). Für schwarz dargestellte Proteine wurde eine Lokalisation in anderen Zellbereichen vorhergesagt. Lokalisationsvorhersagen wurden mit Hilfe der Programme TargetP, Prowler, WolfPSORT und ProtComp 9.0 angefertigt. Proteine aus Monokotyledonen sind blau unterlegt.

Abkürzungen: Aco, *Aquilegia coerulea*, Rocky-Mountains Akelei; At, *Arabidopsis thaliana*, Ackerschmalwand; Bdi, *Brachypodium distachyon*, Zwenke; Bra, *Brassica rapa*, Rübsen; Cpa, *Carica papaya*, Papaya; Ccl, *Citrus clementina*, Mandarine; Csa, *Cucumis sativus*, Gurke; Fve, *Fragaria vesca*, Walderdbeere; Gma, *Glycine max*, Sojabohne; Hv, *Hordeum vulgare*, Gerste; Mgu, *Mimulus guttatus*, Gelbe Gauklerblume; Mtr, *Medicago truncatula*, Schneckenklee; Os, *Oryza sativa*, Reis; Pda, *Phoenix dactylifera*, Dattelpalme; Ppe, *Prunus persica*, Pfirsich; Ptr, *Populus trichocarpa*, Westliche Balsam-Pappel; Rco, *Ricinus communis*, Rizinus; Sbi, *Sorghum bicolor*, Hirse; Sit, *Setaria italica*, Kolbenhirse; Sly, *Solanum lycopersicum*, Tomate; Stu, *Solanum tuberosum*, Tomate; Vvi, *Vitis vinifera*, Weintraube; Zm, *Zea mays*, Mais.

Die subzelluläre Lokalisation der drei WHIRLY-Proteine von *A. thaliana* in den Plastiden (WHIRLY1 und WHIRLY3) und Mitochondrien (WHIRLY2) wurde mittels transienter Transformation von Zwiebelepidermiszellen und Tabakprotoplasten mit Konstrukten für GFP-Fusionsproteine gezeigt (Krause et al., 2005; unveröffentl. Daten E. Hühner). Bei diesen Untersuchungen wurde keines der WHIRLY-Proteine im Zellkern detektiert. Da WHIRLY-Proteine kein Kernlokalisierungssignal besitzen, müssen sie passiv durch die Kernporen transportiert werden, was nur für Proteine mit einer Größe von weniger als 50 kDa möglich ist (Gorlich, 1998). Die WHIRLY:GFP-Fusionsproteine sind mit über 50 kDa zu groß, um im Zellkern akkumulieren zu können. Der mittels GFP-Fusionsproteinen nachgewiesene Transport der WHIRLY-Proteine in die Organellen wurde durch *in vitro* Importassays bestätigt (Krause et al., 2005; unveröffentl. Daten K. Krause). Immunologische Analysen zeigten, dass das HvWHIRLY1-Protein der Gerste innerhalb einer Zelle dual in Plastiden und dem Zellkern lokalisiert ist (Grabowski et al., 2008).

Das WHIRLY2-Protein war bisher nur in den Mitochondrien nachweisbar (Krause et al., 2005; Grabowski, 2008; Maréchal et al., 2008; Tarasenko et al., 2012). Auch WHIRLY3 von *A. thaliana* wurde bisher nicht außerhalb der Plastiden lokalisiert (Krause et al., 2005; Maréchal et al., 2009). Das Protein konnte jedoch *in vitro* zusammen mit WHIRLY1 als Bestandteil eines Komplexes identifiziert werden, der im Zellkern an den Promotor eines *Kinesin*-Gens bindet (Xiong et al., 2009). Es ist daher möglich, dass WHIRLY3 genau wie WHIRLY1 im Zellkern und den Plastiden lokalisiert ist.

Es ist bisher ungeklärt, wo in der Zelle die WHIRLY-Proteine die für sie charakteristischen Tetramere bzw. 24mere bilden. Untersuchungen mit dem bimolekularen Fluoreszenzkomplementationssystem an transient transformierten Epidermiszellen der Zwiebel zeigten nur im Zellkern eine Oligomerisierung der WHIRLY1-Proteine der Gerste und von *A. thaliana* (Grabowski et al., 2008). Da die Epidermiszellen der Zwiebel keine Chloroplasten besitzen, bleibt jedoch offen, ob dieser Befund auf Blattmesophyllzellen übertragen werden kann. Den Ergebnissen des bimolekularen Fluoreszenzkomplementationssystems stehen Befunde aus *A. thaliana* gegenüber, wo mit einem Antikörper, der WHIRLY1 und WHIRLY3 erkennt, 24mere in einer Chloroplastenfraktion detektiert wurden (Cappadocia et al., 2012). Da hierbei aber weder die Reinheit der Chloroplastenfraktion geprüft noch eine Oligomerisierung im Zellkern untersucht wurde, bleibt weiterhin ungeklärt, wo in der Zelle WHIRLY-Proteine miteinander interagieren.

### 1.4.3 Funktionen von WHIRLY-Proteinen

Entsprechend ihrer Lokalisation haben die WHIRLY-Proteine spezifische Funktionen sowohl im Zellkern als auch in den Organellen.

#### 1.4.3.1 Funktionen im Zellkern

Das erste beschriebene WHIRLY-Protein wurde bei Untersuchungen zur transkriptionellen Kontrolle des *PR-10a*-Gens der Kartoffel entdeckt (Després et al., 1995). Die Synthese von PR-Proteinen (*pathogenesis related*) wird durch Infektion mit Pathogenen oder Verwundung der Pflanze verstärkt bzw. induziert (Bol et al., 1990). Der Promotor des *PR-10a*-Gens der Kartoffel wurde näher untersucht, um den Mechanismus der transkriptionellen Kontrolle des Gens während der Pathogenabwehr zu verstehen. Generell erfolgt die transkriptionelle Kontrolle der Expression von Genen über die Bindung von Proteinen, die als Transkriptionsfaktoren oder *trans*-Faktoren bezeichnet werden, an bestimmte Elemente im Promotor eines Gens, die sogenannten *cis*-Elemente (Mitchell und Tjian, 1989). Die drei *trans*-Faktoren SEBF, PBF1 und PBF2, die an zwei bestimmte *cis*-Elemente des Promotors des *PR10a*-Gens der Kartoffel binden, spielen bei der durch Pathogene induzierten Regulation der *PR-10a*-Genexpression eine wichtige Rolle. PBF1 und PBF2 (*PR-10a binding factor*) binden an ein 30 bp langes ERE-Motiv (*elicitor response element*) im *PR-10a*-Promotor und aktivieren die Expression des *PR-10a*-Gens (Després et al., 1995; Desveaux et al., 2000, 2004) (Abb. 4).

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass PBF2 aus vier StWHIRLY1-Untereinheiten besteht (Desveaux et al., 2000, 2002). PBF2 bzw. das WHIRLY1-Homotetramer bindet spezifisch an einen *inverted repeat*-Bereich (IR) des ERE-Motivs mit der Nukleinsäuresequenz TGACAnnnnTGTCa (Desveaux et al., 2000) (Abb. 4). In einer späteren Studie wurde jedoch gezeigt, dass die Nukleinsäureabfolge GTCAAAAA/T für eine Aktivierung des *PR-10a*-Gens durch PBF2 bzw. WHIRLY1 wichtig ist (Desveaux et al., 2004). Die beiden *cis*-Elemente von WHIRLY1 (TGACAnnnnTGTCa und GTCAAAAA/T) besitzen nur teilweise dieselbe Basenabfolge, finden sich jedoch überlappend auf dem *PR-10a*-Promotor wieder (Abb. 4). Die Sequenz GTCAAAAA/T ist auch in *A. thaliana* häufig in Promotoren von *PR*-Genen zu finden (Desveaux et al., 2004). StWHIRLY1 ist in uninfizierten Pflanzen bereits vorhanden und wird nicht erst in Folge einer Pathogeninfektion gebildet. Da die Menge des Proteins in Kernfraktionen aus Kartoffelknollen nach und vor der Infektion gleich war, wird angenommen, dass durch Eindringen des Pathogens und durch die damit einhergehende Synthese von Salicylsäure (SA) die Bindung von StWHIRLY1 an den Promotor induziert wird (Desveaux et al., 2000).

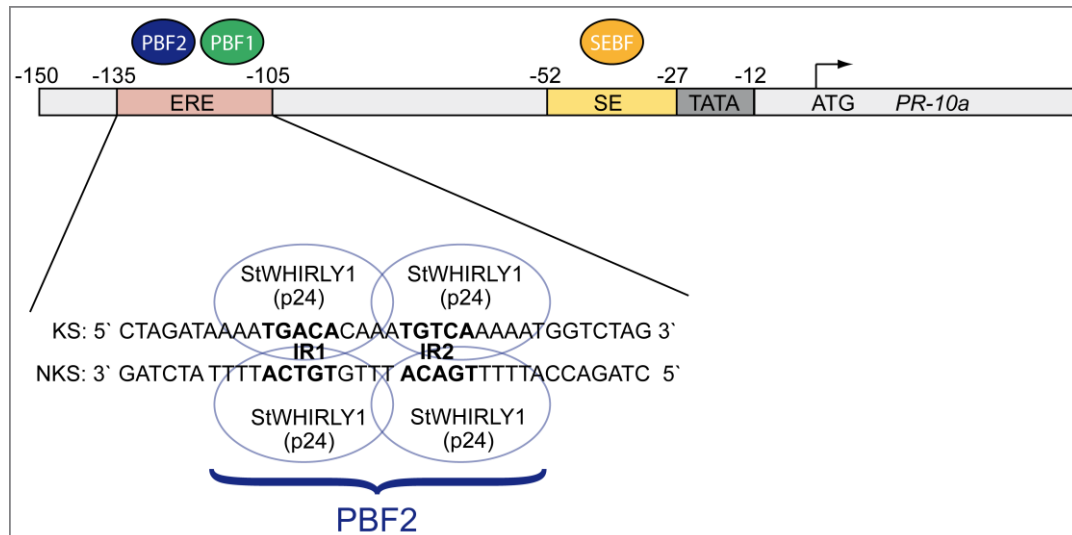


Abb. 4: Schematische Darstellung des Promotorbereichs (-150 bis +50 bp) des *PR-10a*-Gens der Kartoffel. Es sind die beiden *cis*-Elemente dargestellt, die im Zusammenhang mit der Pathogenantwort identifiziert wurden (ERE, *elicitor response element*; SE, *silencing element*). Die *trans*-Faktoren PBF1, PBF2 (*PR-10a Binding Faktor*) und SEBF (*silencing element binding factor*) sind jeweils über dem Promotorelement, an das sie binden, dargestellt. Der Transkriptionsstart ATG ist mit einem Pfeil markiert. Die Bindestellen des *trans*-Faktors PBF2 sind in der unten gezeigten Sequenz des ERE-Motivs fett dargestellt und mit IR1 und IR2 (*inverted repeat* 1 und 2) bezeichnet. PBF2 ist ein Homotetramer aus vier WHIRLY1-Proteinen (StWHIRLY1). Je eine Untereinheit des Tetramers bindet an einen Strang der beiden IRs. TATA: Bereich der TATA-Box; KS: kodierende Sequenz; NKS: nicht kodierende Sequenz

Das WHIRLY1-Protein von *A. thaliana* zeigt 75 % Sequenzidentität zu dem verwandten Protein der Kartoffel (ohne N-terminale Importsequenz) und bindet wie StWHIRLY1 an einzelsträngige DNA. In *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass die Bindung von WHIRLY1 an Promotoren durch SA induziert wird, wie es bereits für das WHIRLY1-Protein der Kartoffel angenommen wurde (Desveaux et al., 2004). Die Bindung an die einzelsträngige DNA wird dabei innerhalb von fünf Stunden nach Behandlung mit SA eingeleitet, erreicht ihren Höhepunkt nach zehn Stunden und nimmt danach wieder ab. Weiterhin weisen *AtWHIRLY1*-Mutanten eine schwächere Expression des *PR-1*-Gens nach Behandlung der Pflanzen mit SA sowie eine schwächere Resistenz gegenüber dem Oomyceten *Phytophthora parasitica* auf (Desveaux et al., 2004). Diese Befunde zeigen, dass WHIRLY1 eine Rolle bei der Pathogenresistenz im Zusammenhang mit SA spielt.

In Gerste wurde das *cis*-Element der WHIRLY-Transkriptionsfaktoren auch im Promotor des Gens *HvS40* gefunden. Durch Gelretardierungsanalysen mit Kernproteinen aus unterschiedlich alten Gerstenblättern konnte gezeigt werden, dass WHIRLY1 nur in jungen Blättern an den *HvS40*-Promotor bindet (Dähnhardt, 2003). Da das *HvS40*-Gen spezifisch während der Seneszenz exprimiert wird (Krupinska et al., 2002), ist anzunehmen, dass HvWHIRLY1 ein Repressor des Gens ist.

Neben der transkriptionellen Kontrolle von *PR*-Genen und des Gens *HvS40* sind WHIRLY-Proteine auch in die Regulation eines *Kinesin*-Gens involviert (Xiong et al.,

2009). Kinesine sind Motorproteine, die ihre Fracht innerhalb der Zelle entlang von Mikrotubuli transportieren (Bloom und Endow, 1995). Die Expression des *AtKP1*-Gens (At3g44730) von *A. thaliana* wird über ein *cis*-Element im Promotor reguliert, welches als KPRE-Motiv (*AtKP1-related element*) bezeichnet wird und an das der KBF1-Transkriptionsfaktor (*KPRE-binding factor 1*) binden kann (Lai et al., 2009). Mittels chromatographischer Methoden und anschließender Massenspektrometrie wurden WHIRLY1 und das verwandte WHIRLY3-Protein als Bestandteile von KBF1 identifiziert. In transgenen Linien, die WHIRLY1 und WHIRLY3 überexprimieren, war die Transkriptmenge von *AtKP1* reduziert. Folglich wurden WHIRLY1 und WHIRLY3 als Repressoren der Expression des *AtKP1*-Gens bezeichnet (Xiong et al., 2009). Zusätzlich zur Funktion als Transkriptionsfaktor kann WHIRLY1 im Zellkern auch an die DNA-Sequenz TTTAGGG binden, die innerhalb der *telomeric repeats* der Telomere wiederholt vorkommt. Telomere sind Nukleoproteinstrukturen an den Enden eukaryotischer Chromosomen, welche die DNA schützen (Watson und Riha, 2010). WHIRLY1 hält die Längen der Telomere während der Replikation der DNA konstant. In WHIRLY1-Mutanten wurde eine Verlängerung der Telomere gezeigt, wohingegen WHIRLY1-Überexpressionslinien kürzere Telomere besaßen (Yoo et al., 2007). Auch das WHIRLY1-Protein der Gerste kann *in vitro* an Telomersequenzen binden (Kilbiński, 2007).

Quantitative *Real-Time* PCR Analysen zur Expression der WHIRLY-Gene in Pflanzen des Wildtyps von *A. thaliana* zeigten, dass die WHIRLY1- und WHIRLY3-Transkriptmenge fünf Stunden nach Behandlung mit SA dreimal so hoch wie vor der Behandlung ist. Zehn Stunden nach der Behandlung mit SA sinkt die Transkriptmenge jedoch wieder (Xiong et al., 2009). Diesem Befund stehen Ergebnisse von Expressionsanalysen mittels RT-PCR in Gerstenblättern gegenüber. Dort konnte für das *HvWHIRLY1*-Gen nach Behandlung mit SA keine Veränderung der Transkriptmenge festgestellt werden. Jedoch wird die Transkriptmenge von *HvWHIRLY2* in Gerstenblättern durch Behandlung mit SA erhöht (Grabowski, 2008). Weitere RT-PCR Analysen in Gerste zeigten, dass die Transkripte beider WHIRLY-Gene verstärkt in meristematischen Blattgeweben nachweisbar sind, aber nur die Transkriptmenge des *HvWHIRLY2*-Gens auch in seneszenten Blättern erhöht ist (Grabowski, 2008).

### 1.4.3.2 Funktionen in den Organellen

Seit bekannt wurde, dass WHIRLY-Proteine in Organellen lokalisiert sind, wurden weitere Funktionen der WHIRLY-Proteine aufgedeckt.

Die plastidären WHIRLY-Proteine binden an pDNA, wobei die Bindung im Unterschied zur DNA-Bindung im Zellkern nicht sequenzspezifisch ist (Prikryl et al., 2008; Maréchal et al., 2009; Cappadocia et al., 2010). Die punktförmigen Muster der Fluoreszenzsignale eines WHIRLY1:GFP-Fusionsproteins ähneln der Verteilung der Nukleole in Chloroplasten (Krause et al., 2005). Dementsprechend wurden WHIRLY-Proteine auch in Nukleoidpräparationen nachgewiesen (Pfalz et al., 2006;

Maréchal et al., 2009; Majeran et al., 2012), wobei das Protein jedoch eher in der Peripherie der TAC-Struktur zu finden ist und nur locker mit dieser assoziiert ist (Melonek et al., 2010). Kolokalisationsstudien mit dem TAC-Protein PEND zeigen jedoch, dass nicht alle Nukleole einer Plastide das WHIRLY1-Protein besitzen (Melonek et al., 2010). WHIRLY1 konnte zusätzlich im Stroma lokalisiert werden (Grabowski et al., 2008; Prikryl et al., 2008; Melonek et al., 2010).

WHIRLY1 und WHIRLY3 von *A. thaliana* beeinflussen die Reparatur und Stabilität der pDNA, da sie in den Plastiden eine Funktion als "Anti-Rekombinationsproteine" haben (Maréchal et al., 2009; Cappadocia et al., 2010). In einer Doppelmutante, der die beiden plastidären WHIRLY-Proteine fehlen, wird die pDNA verstärkt neu angeordnet und falsch rekombiniert. Wie WHIRLY1 und WHIRLY3 ihre Funktion als "Anti-Rekombinationsproteine" ausführen ist unbekannt. Entweder binden die Proteine während der Reparatur von Doppelstrangbrüchen die herausgeschnittene DNA (Cappadocia et al., 2010) oder sie stabilisieren einzelsträngige Bereiche der pDNA (Prikryl et al., 2008; Maréchal et al., 2009). Allerdings verliert WHIRLY1 die Fähigkeit zur Reparatur von DNA, wenn das zweite Lysin in der WHIRLY-Domäne (KGKAAL) mutiert wird. Diese Mutation verändert nicht die Fähigkeit des Proteins, an kurze einzelsträngige DNA zu binden, sondern verhindert die Bildung von WHIRLY-24meren (Cappadocia et al., 2012). Folglich ist die 24mer-Struktur entscheidend für die Funktion der WHIRLY-Proteine bei der Reparatur und Stabilität der pDNA.

WHIRLY1 von Mais bindet *in vitro* an plastidäre DNA und RNA, wobei die Bindung an DNA nicht sequenzspezifisch ist, die Bindung an RNA jedoch spezifisch für einige RNA Sequenzen, wie die Introne der *atpF*- und *rps12*-Transkripte, ist (Prikryl et al., 2008). *Rip-Chip* Analysen in Gerste bestätigten diesen Befund (Melonek et al., 2010). Somit sind WHIRLY-Proteine nicht nur DNA- sondern auch RNA-Bindeproteine. Eine generelle Funktion von WHIRLY1 während der plastidären Transkription scheint jedoch unwahrscheinlich, da *run-on* Analysen mit Mutanten von Mais und Gerste keine veränderten Transkriptionsrate im Vergleich zum Wildtyp erkennen ließen (Prikryl et al., 2008; Melonek et al., 2010).

Im Unterschied zum WHIRLY1-Protein wurde das WHIRLY2-Protein bis jetzt nur in Mitochondrien nachgewiesen. In Kartoffeln wurde gezeigt, dass WHIRLY2 an mitochondriale RNA binden kann (Vermel et al., 2002). In *A. thaliana* wurde zusätzlich gezeigt, dass das Protein auch mit mitochondrialer DNA (mtDNA) assoziiert, wobei die Bindung an die DNA nicht sequenzspezifisch erfolgt (Maréchal et al., 2008; Tarasenko et al., 2012). Eine Überexpression von *WHIRLY2* ruft eine Störung der Funktion der Mitochondrien hervor. Die Störung wird durch eine verringerte Menge an mitochondrialen Transkripten und mtDNA ausgelöst, was zusätzlich zu einer geringeren Aktivität der Atmungskette führt (Maréchal et al., 2008). Pflanzen der *WHIRLY2*-Überexpressionslinien sind klein, haben deformierte Blätter und weisen eine frühe Seneszenz auf, wohingegen *why2*-Mutanten keinen Phänotyp zeigen (Maréchal et al., 2008).



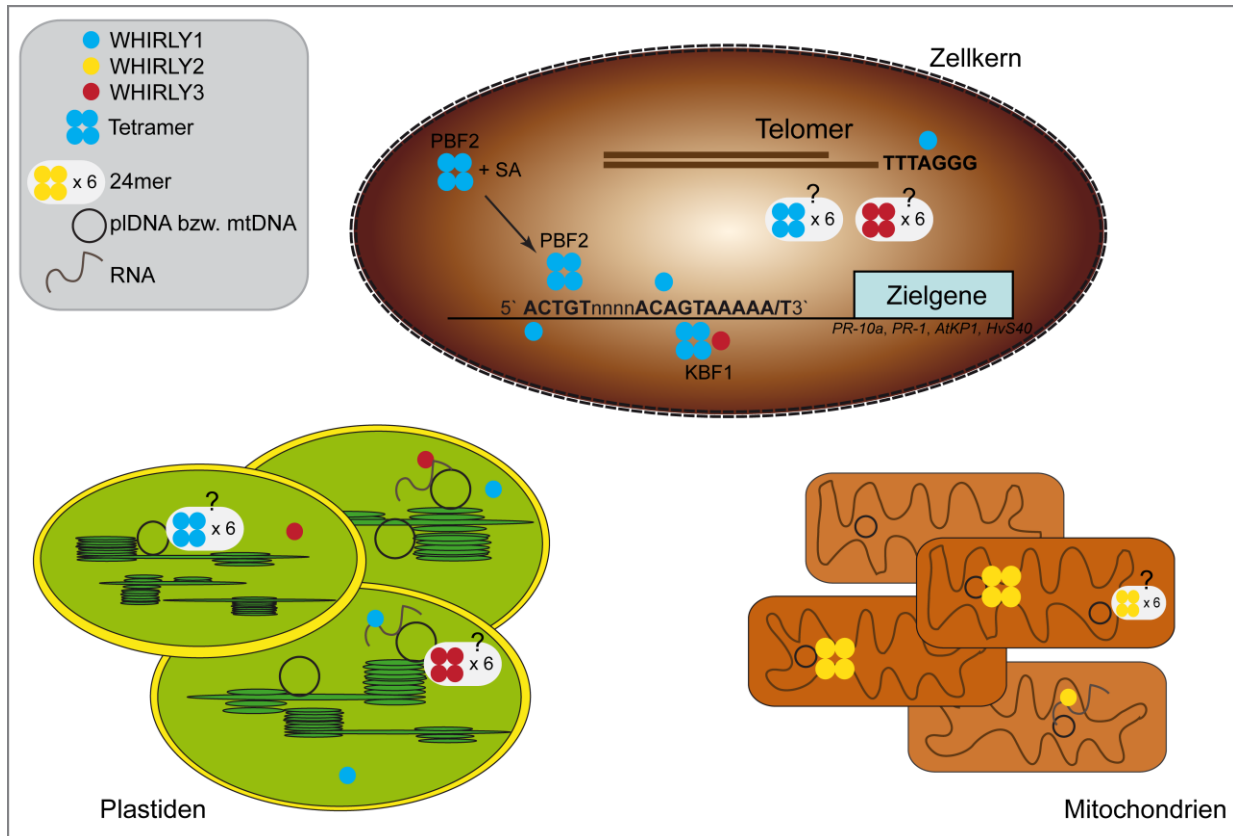


Abb. 5: Zusammenfassende Darstellung zur Lokalisation und Funktion von WHIRLY-Proteinen in pflanzlichen Zellen. pDNA: plastidäre DNA; mtDNA: mitochondriale DNA; SA: Salicylsäure; PBF2: *PR-10a Binding Faktor*; KBF1: *AtKP1-related-element-binding factor 1*

#### 1.4.3.3 Phänotypen von WHIRLY-Mutanten

Die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Funktionen der WHIRLY-Proteine wurden mit Hilfe von Mutanten untersucht. Entgegen der Erwartung zeigen WHIRLY1-Mutanten von verschiedenen Pflanzenarten unterschiedliche Phänotypen (Tab. 2).

Die ersten beschriebenen WHIRLY1-Mutanten waren zwei TILLING-Mutanten (*targeting induced local lesions in genomes*) von *A. thaliana*. Sie zeigten mit Ausnahme einer schwächeren Resistenz gegenüber *Phytophthora parasitica* keinen auffälligen Phänotyp (Desveaux et al., 2004). In derselben Arbeit wurde beschrieben, dass die T-DNA-Insertionsmutanten Salk\_023713 und Salk\_039000 (hier als *why1-1* und *why1-3* bezeichnet) nur heterozygot lebensfähig sind. Die T-DNA-Insertionsstelle liegt im Fall von *why1-1* im ersten Exon von WHIRLY1 und im Fall von *why1-3* im Promotor des Gens. In einer späteren Studie konnte die Linie *why1-1* entgegen der vorangegangenen Beschreibung homozygot vermehrt werden. *Why1-1* wurde zusammen mit der T-DNA-Insertionsmutante Salk\_147680 (hier als *why1-2* bezeichnet), die ebenfalls eine T-DNA-Insertion im ersten Exon von WHIRLY1 besitzt, untersucht. In beiden Mutanten wurde eine Verlängerung der Telomere gezeigt, ansonsten war jedoch kein auffälliger Phänotyp nachweisbar (Yoo et al., 2007).

Im Unterschied zu den Mutanten von *A. thaliana* waren zwei *Mu*-Transposon-Mutanten von Mais (*Zea mays*), in denen die WHIRLY1-Proteinmenge auf etwa 6 % der Menge des Wildtyps reduziert war, gebleicht und nicht lebensfähig. Diese schwere Störung der Chloroplasten wurde auf eine reduzierte Menge an plastidären Ribosomen zurückgeführt (Prikryl et al., 2008).

Tab. 2: Liste der bekannten WHIRLY1- und WHIRLY3-Mutanten aus verschiedenen Pflanzenarten.

Bezeichnung	Spezies	Beschreibung	Phänotyp	Literatur
WHIRLY1-TILLING	<i>A. thaliana</i>	zwei unabhängige Linien; TILLING-Mutation im WHIRLY1-Gen	schwächere Resistenz gegenüber <i>Phytophthora parasitica</i>	Desveaux et al., 2004
why1-1 (Salk_023713)		T-DNA-Insertion im ersten Exon von WHIRLY1	längere Telomere	Yoo et al., 2007
why1-2 (Salk_147680)		T-DNA-Insertion im ersten Exon von WHIRLY1	längere Telomere	
why1-3 (Salk_03900)		T-DNA-Insertion im Promotor von WHIRLY1	nicht lebensfähig	Desveaux et al., 2004
why1-p (Salk_099937)		T-DNA-Insertion im Promotor von WHIRLY1	kein Unterschied zum Wildtyp	Maréchal et al., 2009
til-why3 (WHIRLY3-TILLING)		TILLING-Mutation im WHIRLY3-Gen	kein Unterschied zum Wildtyp	
why1-p x til-why3		WHIRLY1/3-Doppelmutante; Kreuzung aus why1-p und til-why3	4,6 % der Pflanzen haben variierte Blätter	
why1-1: MuDR	<i>Zea mays</i>	<i>Mu</i> -Transposon-Insertion im ersten Exon von WHIRLY1	weiß; stirbt nach Ausbildung der ersten vier bis sechs Blätter	Prikryl et al., 2008
why1-2: Mu1/1.7		<i>Mu</i> -Transposon-Insertion im Promotor von WHIRLY1	hellgrün; stirbt nach Ausbildung der ersten vier bis sechs Blätter	
E1, E7, E9	<i>Hordeum vulgare</i>	RNAi-Linien für WHIRLY1	bei Standardanzucht kein Unterschied zum Wildtyp; bei Anzucht mit kontinuierlicher Belichtung und erhöhter Lichtintensität weiße Blätter	Melonek et al., 2010; unveröffentlicht. Daten K. Krupinska

Es wäre denkbar, dass die untersuchten WHIRLY1-Mutanten von *A. thaliana* keine Störung der Chloroplasten zeigen, da das nahe verwandte Protein WHIRLY3 die Funktion von WHIRLY1 teilweise oder ganz übernehmen kann. Dementsprechend wurde eine WHIRLY1/3-Doppelmutante von *A. thaliana* erstellt, indem die T-DNA-Insertionsmutante Salk\_099937 (hier als *why1-p* bezeichnet) mit einer WHIRLY3-TILLING-Mutante (hier als *til-why3* bezeichnet) gekreuzt wurde (Maréchal et al., 2009). Die Mutante *why1-p* besitzt eine T-DNA-Insertion im Promotorbereich des Gens WHIRLY1. Somit ist nicht auszuschließen, dass es anstelle von einer vollständigen Ausschaltung nur zu einer umwelt- oder entwicklungsabhängig veränderten Expression von WHIRLY1 kommt. Bei immunologischen Analysen mit einem Antikörper, der die beiden Proteine WHIRLY1 und WHIRLY3 erkennt, war in der *why1-p* x *til-why3*-Mutante kein Protein mehr nachweisbar (Maréchal et al., 2009). 4,6 % der *why1-p* x *til-why3*-Pflanzen zeigten weiße Blätter oder Blattbereiche, was als Variegation bezeichnet wird (Maréchal et al., 2009). Viele Mutanten, denen Proteine aus den Plastiden fehlen, bilden variierten Blätter, jedoch zumeist an allen Pflanzen (Yu et al., 2007; Xu et al. 2011a). Warum bei

*why1-p x til-why3* nur einige wenige Pflanzen betroffen sind und was der Grund für das Auftreten bzw. Ausbleiben des Phänotyps ist, wurde nicht untersucht. Der Phänotyp von *why1-p x til-why3* wurde auf rekombinierte pDNA zurückgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass die *WHIRLY1*-Maismutanten, deren Phänotyp sehr viel stärker ausgeprägt ist, viel weniger rekombinierte pDNA besitzen als *why1-p x til-why3* von *A. thaliana* (Maréchal et al., 2009).

In Gerste wurde die *WHIRLY1*-Transkriptmenge durch RNAi so stark verringert, dass die *WHIRLY1*-Proteinmenge bis auf ca. 1 % reduziert war (Melonek et al., 2010; unveröffentl. Daten K. Krupinska). Bei Anzucht im kontinuierlichen Licht bildeten verschiedene RNAi-Linien (E1, E7, E9) weiße Blätter. Diese Störung der Chloroplasten zeigte sich besonders auffällig bei höheren Lichtintensitäten (unveröffentl. Daten K. Krupinska).

### 1.5 Zielsetzung

Immunologische Analysen zeigten, dass das HvWHIRLY1-Protein der Gerste innerhalb einer Zelle gleichzeitig in den Plastiden und im Zellkern zu finden ist und in beiden Kompartimenten das gleiche Molekulargewicht hat. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, am Beispiel des zum HvWHIRLY1-Protein der Gerste verwandten WHIRLY1-Proteins von *Arabidopsis thaliana* die molekularen Vorgänge aufzuklären, welche für die besondere Verteilung von WHIRLY1 in der Zelle verantwortlich sind. Um zu prüfen, ob WHIRLY1 aus den Plastiden in den Zellkern umverteilt wird, sollen Untersuchungen an Plastomtransformatanten des Tabaks durchgeführt werden, die die *AtWHIRLY1*-Sequenz ohne plastidäre Importsequenz in Fusion mit der Sequenz für das HA-Tag innerhalb der Plastiden exprimieren.

Neben WHIRLY1 findet man in *A. thaliana* mit WHIRLY3 ein zweites plastidäres WHIRLY-Protein. Um zu klären, warum *A. thaliana* ein zweites plastidäres WHIRLY-Protein besitzt, sollen die subzelluläre Lokalisation und die Interaktionspartner von WHIRLY3 im Vergleich zu WHIRLY1 untersucht werden. Von den Interaktionspartnern der WHIRLY-Proteine werden Hinweise auf die Funktionen der Proteine erwartet. Weitere Hinweise auf die Funktionen werden von Studien zur Genexpression und von phänotypischen Analysen mit Mutanten erwartet. Um Funktionen des WHIRLY1-Proteins in den Plastiden und im Zellkern unterscheiden zu können, sollen transgene Linien untersucht werden, in denen das WHIRLY1-Protein entweder in Plastiden und im Zellkern oder nur in einem der beiden Kompartimente akkumulieren kann.

Vorangegangene Arbeiten lieferten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Funktion von WHIRLY-Proteinen und dem Phytohormon Salicylsäure (SA). SA beeinflusst Entwicklungsprozesse wie die Keimung. An keimenden Samen von *A. thaliana* soll daher untersucht werden, ob die biologische Wirksamkeit von SA durch WHIRLY-Proteine vermittelt wird.

Das dual lokalisierte WHIRLY1-Protein ist ein idealer Kandidat für die Übertragung von Plastidensignalen zum Zellkern. Die Bedeutung des WHIRLY1-Proteins für die plastidäre retrograde Kommunikation soll ermittelt werden. Um zu prüfen, ob *why1*-Mutanten zu den *gun*-Mutanten gehören, soll die Expression von Zielgenen retrograder Plastidensignale nach Behandlung von Keimlingen mit Norflurazon bzw. Lincomycin untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Laborchemikalien wurden, sofern nicht anders im Text vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (München), Bio-Rad (München), Fischer Scientific (Düsseldorf), Amersham GE Healthcare (Freiburg) und Agrisera (Vännäs, Schweden) bezogen. Sie erfüllten den Reinheitsgrad „p.a.“.

Die Restriktionsendonukleasen sowie DNA- (*GeneRuler<sup>TM</sup> 1 kb DNA-Ladder*) und Protein-Größenstandards (*Prestained-Protein-Ladder 10-170 kDa*) wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Alle weiteren Enzyme stammten von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe) und Promega (Mannheim).

Alle Lösungen wurden mit Wasser angesetzt, das mit Hilfe einer Millipore-Anlage (Seradest SD 2000, USF Elga Seral, Ransbach-Baumbach) deionisiert wurde. Die Lösungen und Gerätschaften, die bei der Arbeit mit Nukleinsäuren Verwendung fanden, wurden für 20 min bei 120 °C autoklaviert.

### 2.2 Pflanzenmaterial

#### 2.2.1 Anzucht verschiedener Genotypen von *Arabidopsis thaliana*

Als Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*, L.) wurde der Ökotyp Columbia verwendet. Zusätzlich wurden für die Versuche folgende Mutanten und transgene Linien eingesetzt:

*why1-1*: T-DNA-Insertionsmutante, die unter der Bezeichnung Salk\_023713 von NASC (*European Arabidopsis Stock Centre*) erworben wurde und eine T-DNA-Insertion im *WHIRLY1*-Gen (At1g14410) trägt. Die Insertionsstelle liegt nach dem vierten Nukleotid der kodierenden Sequenz des Gens. Siehe auch Yoo et al., 2007; Grabe, 2007; Isemer et al., 2012b

*why1-2*: T-DNA-Insertionsmutante, die unter der Bezeichnung Salk\_147680 von NASC erworben wurde und eine T-DNA-Insertion im *WHIRLY1*-Gen trägt. Die Insertionsstelle liegt nach dem 28. Nukleotid der kodierenden Sequenz des Gens. Siehe auch Yoo et al., 2007; Isemer et al., 2012b

*why2*: T-DNA-Insertionsmutante, die unter der Bezeichnung Salk\_118900 von NASC erworben wurde und eine T-DNA-Insertion im *WHIRLY2*-Gen (At1g71260) trägt. Die Insertionsstelle liegt im letzten Intron des Gens.

*til-why3*: TILLING-Mutante (*targeting induced local lesions in genomes*), die von N. Brisson und Mitarbeitern charakterisiert (Maréchal et al., 2009) und zur Verfügung gestellt wurde. Hier wurde das 138. Basentriplett des *WHIRLY3*-Gens (At2g02740) von TGG zu TGA mutiert, wodurch an dieser Stelle ein Stoppcodon entsteht.

*why1-p x til-why3*: Die *til-why3*-Mutante wurde mit einer T-DNA-Insertionsmutante (Salk\_099937, als *why1-p* bezeichnet), welche eine T-DNA-Insertion im Promotorbereich des Gens *WHIRLY1* trägt (102 Basenpaare vor dem Startcodon ATG), gekreuzt. Die Doppelmutante wurde zur Verfügung gestellt von N. Brisson (Maréchal et al., 2009).

*gun1-1* und *gun1-102*: In diesen Mutanten wurden durch Behandlung mit Ethylmethansulfonat Mutationen im *GUN1*-Gen (At2g31400) hervorgerufen. Beide Linien wurden von D. Leister (Universität München) zur Verfügung gestellt. Siehe auch Ruckle et al., 2007; Koussevitzky et al., 2007; Voigt et al., 2010

*gun5*: In dieser Mutante wurde durch Behandlung mit Ethylmethansulfonat eine Mutation im *GUN5*-Gen (At5g13630) hervorgerufen. Die Linie wurde von B. Grimm (Universität Berlin) zur Verfügung gestellt. Siehe auch Susek et al., 1993

*abi4*: In dieser Mutante wurde durch Behandlung mit Gammastrahlen eine Mutation im *ABI4*-Gen (At2g40220) hervorgerufen. Die Mutante wurde unter der Bezeichnung N8104 von NASC erworben.

*WHIRLY2:YFP*: Transgene Linie, in der die *WHIRLY2*-Sequenz in Fusion mit der Sequenz für YFP unter Kontrolle des 35S-Promotors im Wildtyp exprimiert wird. Erstellt und zur Verfügung gestellt von A. Costa und M. Zottini (Universität Padua, Italien).

*pnWHIRLY1:HA*: Transgene Linie, in der die *WHIRLY1*-Sequenz in Fusion mit der Sequenz für das HA-Tag unter Kontrolle des 35S-Promotors im genetischen Hintergrund der *why1-1*-Mutante exprimiert wird. Erstellt von N. Grabe (Grabe, 2007). Siehe auch Isemer et al., 2012b

*nWHIRLY1:HA*: Transgene Linie, in der die *WHIRLY1*-Sequenz, ohne den Bereich, welcher für die plastidäre Importsequenz kodiert, in Fusion mit der Sequenz für das HA-Tag unter Kontrolle des 35S-Promotors in der *why1-1*-Mutante exprimiert wird. Erstellt von N. Grabe (Grabe, 2007). Siehe auch Isemer et al., 2012b

*pWHIRLY1:HA*: Transgene Linie, in der die vollständige *WHIRLY1*-Sequenz in Fusion mit einer Kernexportsequenz sowie der Sequenz für das HA-Tag unter

Kontrolle des 35S-Promotors in der *why1-1*-Mutante exprimiert wird. Erstellt von N. Grabe (Grabe, 2007).

*A. thaliana* wurde standardmäßig unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer bei 21 °C und bei einer 13-stündigen Beleuchtung mit einer Lichtstärke von 80 bis 100  $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{ m}^{-2}$  angezogen. Die Aussaat erfolgte entweder direkt auf ein Gemisch aus Sand und TKS2 Kultursubstrat (Floragard, Oldenburg) im Verhältnis 1:2 oder in Torfquelltopfen (Jiffy-7, Jiffy Products International AS, Norwegen). Nach zwei Wochen wurden die Keimlinge pikiert. Unter diesen Bedingungen bildeten die Pflanzen nach sieben bis neun Wochen Blüten und reife Samen konnten nach zwölf bis 14 Wochen geerntet werden.

Für die Anzucht von *A. thaliana* unter Einfluss von Norflurazon und Lincomycin wurden Samen sterilisiert (Aronsson und Jarvis, 2011) und auf Agar-Platten mit MS-Medium (2.4.2) gekeimt. Dem Medium wurde entweder Norflurazon (Sigma Aldrich, Steinheim) in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  (Voigt et al., 2010) oder Lincomycin (Duchefa, Haarlem, Niederlande) in einer Konzentration von 220  $\mu\text{g/ml}$  (Koussevitzky et al., 2007) zugesetzt. Nach Quellung der Samen bei 6 °C üN erfolgte die Anzucht bei 21 °C und einer kontinuierlichen Beleuchtung von 120  $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ . Die Keimlinge wurden nach sechs Tagen geerntet.

### 2.2.2 Untersuchungen zur Keimung von *Arabidopsis thaliana*

Samen von *A. thaliana* wurden wie beschrieben (Aronsson und Jarvis, 2011) sterilisiert und auf MS-Medium (2.4.2) mit 1,5 % (w/v) Saccharose ausgelegt. Nach einer Quellphase bei 6 °C üN erfolgte die Anzucht bei kontrollierten Wachstumsbedingungen in einer Klimakammer bei 21 °C mit einer 16-stündigen Beleuchtung bei einer Lichtintensität von 60  $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ . Für Keimungsexperimente in Gegenwart von Salicylsäure (SA) wurde ein Neutralfilter verwendet, der das UV Licht aus dem Lichtspektrum filterte und die Lichtintensität auf 30  $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{ m}^{-2}$  reduzierte. Für vergleichende Keimungsexperimente wurden Samen mit vergleichbarem Alter und Lagerungsbedingungen verwendet. Außerdem enthielten alle Platten gleiche Mengen an MS-Medium.

Um während der Keimung den Phänotyp von Mutanten bzw. transgenen Linien mit dem des Wildtyps zu vergleichen, wurden sterile Samen auf rechteckigen Platten ausgebracht. Die Platten wurden aufrecht stehend kultiviert.

Der Einfluss von Phytohormonen auf die Keimung wurde in Anlehnung an beschriebene Methoden untersucht (Choy et al., 2008). Zur Herstellung einer Stammlösung wurde das Natriumsalz der Salicylsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim) in sterilem Wasser bis zu einer Konzentration von 1 M verdünnt. Abscisinsäure (ABA, 6 cis-trans; Sigma A1049, Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde zunächst in 1 ml 1 M NaOH gelöst und dann mit sterilem Wasser auf eine Endkonzentration von 25 mM gebracht. Der Inhibitor Abamin (zur Verfügung gestellt von T. Asami; Han et al., 2004) wurde in

Dimethylsulfoxid bis zu einer Konzentration von 130 mM gelöst. Pro Platte wurden 20 bis 50 Samen ausgelegt. Sieben Tage nach Quellung wurde die Anzahl der Samen, bei denen die Keimwurzel mit bloßem Auge sichtbar war, ermittelt. Jeweils eine Platte wurde als unabhängiges Experiment gewertet.

### 2.2.3 Anzucht verschiedener Genotypen von *Nicotiana tabacum*

Als Wildtyp wurde *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana genutzt. Diese Sorte wird standartmäßig zur Erstellung von Plastomtransformaten verwendet. Die Plastomtransformatenlinien, die die Sequenz für das WHIRLY1-Protein von *A. thaliana* in Fusion mit der Sequenz für das HA-Tag in Plastiden exprimieren, wurden somit auch in der Sorte Petit Havana erstellt (Isemer et al., 2012a).

Zur selektiven Anzucht wurden sterilisierte Samen der Plastomtransformaten auf MS-Medium (2.4.2) mit 3 % (w/v) Saccharose und dem Antibiotikum Spectinomycin (500mg/L) bei 22 °C und 16 Std. Licht (100  $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ) kultiviert. Die Anzucht des Wildtyps erfolgte in gleicher Weise ohne Spectinomycin. Ab der dritten Woche wurden die Keimlinge weiter auf Einheitserde im Gewächshaus unter natürlichen Lichtbedingungen gehalten.

## 2.3 Bestimmung der maximalen Effizienz des Photosystems II

Die Ermittlung der maximalen Quanteneffizienz des Photosystems II ( $F_v/F_m$ ) fand in Anlehnung an Schreiber et al. (1986) statt und wurde mit Hilfe des Imaging-PAM (Puls-Amplituden-Modulation)-Chlorophyllfluorometers der Firma Walz GmbH (Effeltrich) durchgeführt. Die Pflanzen wurden für 30 min dunkeladaptiert, um eine vollständige Oxidation der Reaktionszentren hervorzurufen. Die Grundfluoreszenz  $F_0$  wurde über gepulstes Schwachlicht von 0,5  $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{ m}^{-2}$  erzeugt. Das Reaktionszentrum des Photosystems II wurde durch einen Sättigungspuls von 2400  $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{ m}^{-2}$  vollständig reduziert. Die dadurch erzeugte maximale Fluoreszenz  $F_m$  wurde gemessen. Die maximale Quantenausbeute ( $F_v/F_m$ ) wurde wie folgt errechnet:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

Für die Auswertung der Daten wurde die ImagingWin-Software benutzt. Es wurde jeweils der Mittelwert über alle Blätter der Rosetten von fünf Pflanzen bestimmt.



### 2.4 Allgemeine molekularbiologische Methoden

#### 2.4.1 Lösungen und Puffer

Die folgenden Lösungen und Puffer fanden im Rahmen dieser Arbeit Verwendung:

10 x Bromphenolblau:	50 % (v/v) 0,1 %	Glycerin Bromphenolblau
10 x TAE-Puffer:	242 g/l 57,1 ml/l 100 ml/l pH 8 mit HCl einstellen	Tris Eisessig 0,5 M EDTA Stammlösung
1 x TE-Puffer:	10 mM 1 mM	Tris/HCl, pH8 EDTA
20 x SSC:	3 M 300 mM	NaCl Natriumcitrat, pH 7
PBS:	8,1 mM 1,5 mM 150 mM pH 7,4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> NaCl

#### 2.4.2 Medien

Die folgenden Medien fanden im Rahmen dieser Arbeit Verwendung:

MS-Medium	4,4 g/l	MS (Duchefa M0245)
(Murashige-Skoog-Medium):	x g/l	Saccharose
	1 % (w/v)	Phytoagar (Duchefa)

Das Medium wurde vor Gebrauch autoklaviert. Die Menge an Saccharose variierte je nach experimentellem Ansatz zwischen 0 und 3 % (w/v). Für die Herstellung von MS-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1 % (w/v) Agar zugesetzt.

LB-Medium:	10 g/l	NaCl
(Luria-Bertani-Medium):	10 g/l	Pepton
	5 g/l	Hefeextrakt

Das Medium wurde vor Gebrauch autoklaviert. Für die Herstellung von LB-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1 % (w/v) Agar zugesetzt.

### 2.4.3 Techniken zur Transformation von Bakterien

#### 2.4.3.1 Bakterienstämme

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten und zur Vervielfältigung rekombinanter Plasmide wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  eingesetzt.

Für die stabile Transformation von *A. thaliana* wurde der Bakterienstamm *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) verwendet (Koncz und Schell, 1986).

#### 2.4.3.2 Anzucht von Bakterienkulturen

Die Bakterien des Stammes *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten (2.4.2) üN bei 37 °C im Schüttelinkubator (Labshaker, InnovaTM4400) oder im Brutschrank (WTB Binder) angezogen. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde dem Medium Spectinomycin in einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml zugesetzt.

Die Bakterien des Stammes *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) wurden in Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten (2.4.2) bei 28 °C im Schüttelinkubator (Labshaker, InnovaTM4400) oder im Brutschrank (WTB Binder) angezogen. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde dem Medium Spectinomycin in einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml sowie Rifampycin und Gentamycin in Konzentrationen von 100 bzw. 25  $\mu$ g/ml zugesetzt.

#### 2.4.3.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Flüssigkulturen von *Escherichia coli*

Plasmid-DNA wurde entweder mit dem *Roti®-Prep-Plasmid MINI* Kit (Carl Roth, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers oder nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) isoliert.

Zur Durchführung der Methode nach Birnboim und Doly wurden zunächst 1,5 ml einer Flüssigkultur von *E. coli* (2.4.3.2) bei 13100 x g für 2 min zentrifugiert (Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg). Die sedimentierten Bakterien wurden in 100  $\mu$ l Lösung 1 gründlich resuspendiert und anschließend für 5 min auf Eis gekühlt, wobei die alkalische Lyse der Bakterienzellen erfolgte und die Plasmid-DNA zugänglich wurde. Um Proteine zu denaturieren, wurde die Suspension mit 200  $\mu$ l Lösung 2 vorsichtig vermischt und wiederum für 5 min auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung der genomischen DNA wurde diese mit 150  $\mu$ l 3 M NaAc (pH 4,8-6,0) gefällt und die Suspension anschließend für 10 min bei 16100 x g zentrifugiert. Dem Überstand wurde 0,7 x Vol. Isopropanol zugegeben, um die Plasmid-DNA zu fällen, welche anschließend für 10 min bei 16000 x g pelletiert wurde. Das Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 20  $\mu$ l 1 x TE-Puffer (2.4.1) resuspendiert. Zusätzlich wurde durch eine Behandlung mit 10  $\mu$ g RNase A für 30 min bei 37 °C die noch vorhandene RNA verdaut.

Lösung 1:	50 mM	Glukose
	25 mM	Tris/HCl pH 8
	10 mM	EDTA
Lösung 2:	0,2 M	NaOH
	1 % (w/v)	SDS
	erst direkt vor Gebrauch anmischen	

### 2.4.3.4 Transformation kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Für die Hitzeschocktransformation wurden chemisch kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen verwendet, die mit der CaCl<sub>2</sub>-Methode hergestellt wurden (Cohen et al., 1972). Bis zu 10  $\mu$ l des zu transformierenden Vektors wurden mit 100  $\mu$ l der angetauten Bakterienzellen vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden anschließend die Bakterien einem Hitzeschock von 42 °C für 45 sek ausgesetzt, um die Aufnahme der Vektoren durch die Bakterienmembran zu erleichtern. Danach wurden die Zellen für 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 800  $\mu$ l LB-Medium zugegeben, die Suspension 60 min bei 37 °C geschüttelt und schließlich auf LB-Agarplatten angezogen (2.4.2).

### 2.4.3.5 Erstellung von GFP- und RFP-Konstrukten mit dem Gateway® System

Zur Herstellung von transgenen Pflanzen, die WHIRLY1 in Fusion mit GFP (*green fluorescent protein*) und WHIRLY1 bzw. WHIRLY3 in Fusion mit RFP (*red fluorescent protein*) akkumulieren, wurden mit dem Gateway® System (Invitrogen, Karlsbad) geeignete Konstrukte in binären Vektoren erstellt. Dieses System basiert auf der sequenzspezifischen Rekombinationsreaktion des  $\lambda$ -Phagen. In sogenannten *ENTRY*-Vektoren vorliegende DNA Fragmente, die von Rekombinationssequenzen flankiert sind, können gerichtet in andere Vektoren transferiert werden, die kompatible Rekombinationssequenzen besitzen und als *Destination*-Vektoren bezeichnet werden. Geeignete *ENTRY*-Vektoren (pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO®), in denen die kodierenden Sequenzen für WHIRLY1 bzw. WHIRLY3 ohne Stoppcodon vorlagen, waren bereits vorhanden und wurden für eine LR-Rekombinationsreaktion zur Einbringung der beiden Gene in die *Destination*-Vektoren pB7FWG2.0 und pB7RWG2 verwendet. Der Vektor pB7FWG2.0 beinhaltet die Sequenz für GFP und der Vektor pB7RWG2 die Sequenz für RFP (Karimi et al., 2002).

Für die LR-Rekombinationsreaktion wurden jeweils 50-150 ng des *ENTRY*-Vektors mit 150 ng *Destination*-Vektor gemischt und mit TE-Puffer (pH 8; 2.4.1) auf ein Vol. von 8  $\mu$ l aufgefüllt. Der Lösung wurden 2  $\mu$ l LR Clonase II Enzym-Mix zugesetzt und gut gemischt. Nach einer Inkubation üN bei 25 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2  $\mu$ l Proteinase K und durch eine Inkubation bei 37 °C für 10 min gestoppt.

Fünf µl des Reaktionsansatzes wurden für eine Transformation von *E. coli* verwendet.

### 2.4.3.6 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Das Einbringen von Vektoren (2.4.3.5) in *A. tumefaciens* erfolgte durch Elektroporation. Aliquote von elektrokompenten *A. tumefaciens* Zellen (50 µl) wurden auf Eis aufgetaut. Zehn bis 50 ng des Vektors wurden zu den Zellen hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und in einen Elektroporator (Bio-Rad, Gene Pulser) installiert. Der Elektroporator war wie folgt eingestellt:

Spannung:	2,5 kV
Kapazität:	25 µF
Widerstand:	400 Ω

Sofort nach dem Stromfluss wurde die Küvette aus dem Elektroporator entnommen und die Zellen mit 1 ml LB-Medium (2.4.2) versetzt. Anschließend folgte eine Inkubation für 3 bis 4 Std. in einem Schüttelinkubator (Labshaker, InnovaTM4400) bei 28 °C. Der Ansatz wurde auf Selektionsplatten ausplattiert (2.4.2).

### 2.4.4 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die stabile Transformation von *A. thaliana* mittels *A. tumefaciens* erfolgte in Anlehnung an die Methode von Clough und Bent (1998).

Wildtyp Pflanzen wurden bis zur Blüte angezogen (2.2.1) und die primären Blüten wurden entfernt, um die Bildung von Seitentrieben zu fördern. Vor der Transformation wurden zunächst vorhandene Schoten und reife Blüten entfernt.

Fünfzig ml selektives YEP-Medium wurden mit einer Agrobakterienkolonie (2.4.3.6) beimpft und für 24 Std. bei 28 °C und 140 rpm angezogen, am nächsten Tag in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C für 5 min bei 2.800 x g zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Festwinkelrotor F34-6-38, Eppendorf, Hamburg). Das Pellet wurde so in 5 %iger Saccharoselösung resuspendiert, dass eine OD<sub>600</sub> von 0,5 messbar war (Shimadzu, UV-2501PC, Spectrophotometer, Duisburg). Um die Benetzbarkeit der Lösung zu erhöhen, wurde der Bakteriensuspension 0,05 % (v/v) des Emulsionskonzentrats Silwet-L 77 (LEHLE SEEDS, Round Rock, TX, USA) beigefügt. Die Lösung wurde anschließend auf die unreifen Blüten und die Blattrosette pipettiert. Die behandelten Pflanzen wurden für die nächsten 16 bis 24 Std. stehend oder liegend unter einer Abdeckhaube aufbewahrt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu erreichen, bevor sie weiter angezogen wurden. Um eine höhere Transformationsrate zu gewährleisten, wurde die Transformation im Abstand von jeweils sieben Tagen noch zweimal wiederholt.

YEP-Medium	10 g/l	Hefeextrakt
	20 g/l	Pepton

Das Medium wurde vor Gebrauch autoklaviert.

### 2.4.5 Isolierung von DNA aus Pflanzen

Die Isolierung von DNA aus Blättern von *A. thaliana* oder von *N. tabacum* wurde nach Fulton et al. (1995) durchgeführt.

Zur Isolierung aus frischem Pflanzenmaterial wurden mit einem Pistill in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 100 mg Blätter mit 200 µl Microprep-Puffer homogenisiert. Nach Zugabe von 550 µl Microprep-Puffer wurde die Suspension mit Hilfe eines Vortexgerätes (MS2 Minishaker, IKA Labortechnik, Staufen) gründlich vermischt.

Die Isolierung konnte entsprechend auch mit gefrorenem, gemörsertem Pflanzenmaterial durchgeführt werden. Etwa 100 mg Material wurden hierfür mit 750 µl Microprep-Puffer versetzt und mit Hilfe eines Vortexgerätes gründlich gemischt.

Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 65 °C über 30 bis 120 min, wobei gelegentlich die Proben mit Hilfe eines Vortexgerätes gründlich gemischt wurden. Durch Zugabe von 750 µl eines Gemisches aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1, v:v) und Zentrifugation für 5 min bei 9300 x g (Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg) bildete sich eine obere, wässrige Phase, welche in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde. Um die DNA zu fällen, wurden 350 µl kalter Isopropanol zugesetzt. Die Lösung wurde durch vorsichtiges Invertieren gemischt und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde mit kaltem 70 % EtOH (v/v) gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (2.4.1) bei 65 °C resuspendiert. Da die Proben noch RNA enthielten, wurde eine Behandlung mit 2,5 µg RNase A für 30 min bei 37 °C durchgeführt.

Microprep-Puffer:	2,5 Teile	DNA-Extraktionspuffer
	2,5 Teile	Kernlysepuffer
	1 Teil	5% N-Lauroylsarcosin Natriumsalz
	0,3 bis 0,5 g	Natriumbisulfit pro 100 ml
DNA-Extraktionspuffer:	0,35 M	Sorbitol
	0,1 M	Tris HCl pH 7,5
	5 mM	EDTA
Kernlysepuffer:	2 M	NaCl
	0,2 M	Tris HCl pH 7,5
	0,05 M	EDTA
	2% (w/v)	Cetyltrimethylammoniumbromid

### 2.4.6 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach Sanger und wurde durch das Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB) der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.

### 2.4.7 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von gelösten Nukleinsäuren wurde photometrisch bei Wellenlängen von 280 nm und 260 nm mittels des ND-1000 Spektrophotometers (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) bestimmt. Eine Extinktion von 1 stimmt mit einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml und 40 µg RNA/ml überein. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren bieten ethidiumbromidhaltige Agarosegele (2.4.8). Hier wird eine definierte Menge an Probe mit einer definierten Menge an DNA-Standard wie dem *Lambda-Marker* (100 ng/µl) verglichen. Die Konzentrationsschätzung erfolgte auf einem UV-Tisch bei 312 nm (Multiimage™ Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation, USA).

### 2.4.8 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen, wurde die Agarosegelelektrophorese eingesetzt (Sambrook et al., 1989). Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden ethidiumbromidhaltige Gele mit 0,75 bis 2 % (w/v) Agarose verwendet. Die DNA Proben wurden vor dem Auftrag mit 1/10 x Vol. des Auftragspuffers (10 x Bromphenolblau, 2.4.1) vermischt. Als Laufpuffer diente 1 x TAE (2.4.1). Die Auswertung erfolgte auf einem UV-Tisch bei 312 nm (Multiimage™ Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation, USA).

Für die Aufreinigung von DNA Fragmenten wurde das zu eluierende Fragment aus dem Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten und mit Hilfe des *Nucleo Spin Extract II* Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers eluiert.

### 2.4.9 Vervielfältigung von DNA-Fragmenten mittels PCR

Für die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Die PCR wurde mit der *Taq*-Polymerase (5 U/μl) von MBI Fermentas und dem PCR-Gerät Primus 96 Plus von MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Die Anlagerungstemperatur ( $T_m$ ) entspricht der physikalischen Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide (Tab. M1). Nach der PCR erfolgte eine Agarosegelelektrophorese (2.4.8).

Ein 10 μl Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

x ng	cDNA bzw. DNA
1 μl	10 x Reaktionspuffer ohne $MgCl_2$ ( <i>Taq buffer</i> + $(NH_4)_2SO_4 - MgCl_2$ )
0,2 μl	dNTPs (2 mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,6 μl	$MgCl_2$ (25 mM)
0,5 μl	je Oligonukleotid (10 pmol/μl)
0,05 μl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/μl)
ad 10 μl	H <sub>2</sub> O

Temperaturprofil der PCR:

	Temperatur	Dauer	Zyklen
erste Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	15 sek	
Anlagerung	$T_m^*$	1 min	optimale Zyklenzahl*
Verlängerung	72 °C	1 min	
letzte Verlängerung	72 °C	5 min	1

\* Parameter wurden entsprechend der verwendeten Oligonukleotide gewählt (Tab. M1).

Tab. M1: Sequenzen der Oligonukleotide, die für den Homozygotietest der *WHIRLY1*-T-DNA-Insertionsmutanten von *A. thaliana* verwendet wurden. Die Sequenzen sind jeweils in 5' - 3' Richtung angegeben.

Name	Sequenz	Gen	Gen#	Anmerkungen
why2-1_LP	AAATTACATGTCTGAAGTTGC	<i>WHIRLY1</i>	At1g14410	genspezifische Oligonukleotide
why2-1_RP	TCACTGTCAGTTAAGCCCCAC			
why1-1_LP	TGACCAACAACTGTTGATGG			
why1-1_RP	TCGAATGACCCACGTAAAATC			
Lba1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG			Oligonukleotid spezifisch für die T-DNA

### 2.4.10 Quantitative *Real-Time* PCR

Für die Untersuchungen zur Transkriptmenge wurde die quantitative *Real-Time* PCR verwendet (Holzapfel und Wickert, 2007).

#### 2.4.10.1 Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA erfolgte mit dem *QuantiTect*<sup>®</sup> *Reverse Transcription* Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers.

#### 2.4.10.2 *Real-Time* Polymerasekettenreaktion

Für die Durchführung einer *Real-Time* PCR wurde zunächst die cDNA (2.4.10.1) im Verhältnis 1:3 mit Wasser verdünnt. Die Expression verschiedener Gene wurde mit Hilfe von genspezifischen Oligonukleotide (Tab. M2, M3) untersucht. Hierfür fanden 0,5 µl der verdünnten cDNA Einsatz in einer quantitativen *SYBR-Green Real-Time* PCR Analyse mit dem *QuantiFast SYBR Green PCR* Kit (Qiagen, Hilden), welches laut Anweisungen des Herstellers verwendet wurde. Es wurde das Applied Biosystems 73000 Gerät (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) benutzt. Die quantitative *Real-Time* PCR wurde durch einen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 5 min eingeleitet, welcher von 40 Zyklen gefolgt wurde, die aus einer Denaturierung bei 95 °C für 10 sek und einem Anlagerungs- und Verlängerungsschritt bei 58 °C für 30 sek bestanden. Um die Spezifität der Reaktion zu prüfen, wurde im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, wofür die Temperatur von 60 auf 90 °C erhöht wurde (0,2 °C sek<sup>-1</sup>). Für jede Reaktion wurden mindestens drei technische Replikate erstellt. Die Analyse der Daten erfolgte mittels der 7300 System Software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Die relative Quantifizierung der Transkriptmengen erfolgte mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001).

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in den folgenden Tabellen aufgelistet. Es handelt sich dabei um Oligonukleotide zur Analyse der Genexpression von *A. thaliana* (Tab. M2) sowie von *N. tabacum* (Tab. M3) mittels *Real-Time* PCR. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma (München) bezogen. Sie wurden entweder basierend auf Sequenzinformationen (TAIR) mit Hilfe des Programms Primer 3 oder mit Hilfe des Programms Quant Prime erstellt.



## 2. Material und Methoden

Tab. M2: Sequenzen der Oligonukleotide, die für *Real-Time* PCR Analysen von *A. thaliana* verwendet wurden. Die Sequenzen sind jeweils in 5' - 3' Richtung angegeben.

Name	Sequenz	Gen	Gen#	Anmerkungen
sag12-fwd	GCTTTGCCGGTTTCTGTTG	SAG12	At5g45890	
sag12-rvs	GTTTCCCTTTCTTTATTTGTGTTG			
why1-fwd	ACTTCGAGAAGCAGAGGTTCCGG	WHIRLY1	At1g14410	
why1-rvs	TCTAGCAGGCAATCCTTCAGCAG			
why2-fwd	GCATCCACAAAACCAATGAC	WHIRLY2	At1g71260	
why2-rvs	CATGATGTGTGGAAGAGCAA			
why3-fwd	ACGATAGAACCACGAGCACCAG	WHIRLY3	At2g02740	
why3-rvs	TGTCAGCTTGAACGCACCAGATTC			
act2-fwd	AAGCTCTCCTTTGTTGCTGTT	ACTIN2	At5g47910	Kontrollgen
act2-rvs	GACTTCTGGGCATCTGAATCT			
KP1-fwd	CTCCCTCAACCACAACTAAGGAC	KP1	At3g44730	
KP1-rvs	TGTGTTGAACGACTTCTCCTGAAC			
ABI4-fwd	ACTTCCTCCGCTCAACGCAAAC	ABI4	At2g40220	
ABI4-rvs	CTTTGTCGAACGCCACGGTAAC			
cab1-fwd	TGCACTACTCAACCTCAATGGC	LHCB1.3	At1g29930	
cab1-rvs	AAAGCTTGACGGCCTTACCG			
RbcS-RP	GAAGCTTGGTGGCTTGTAGG	RbcS	At1g67090	
RbcS-LP	ACCTTATCCGCAACAAGTGG			

Tab. M3: Sequenzen der Oligonukleotide, die für *Real-Time* PCR Analysen von *N. tabacum* verwendet wurden. Die Sequenzen sind jeweils in 5'-3' Richtung angegeben.

Name	Sequenz	Gen	Anmerkungen
At-why1_fwd	ACTTCGAGAAGCAGAGGTTCCGG	WHIRLY1	Transgen aus A. thaliana
At-why1_rvs	TCTAGCAGGCAATCCTTCAGCAG		
Nt-actin_fwd	CCTGAGGTCCTTTTCCAACCA	ACTIN	für Analysen mit cDNA und DNA
Nt-actin_rvs	GGATTCCGGCAGCTTCCATT		
psbD_fwd	ACTGGGTCAGTCTGGTTGGTTCTT	psbD	
psbD_rvs	CCATGAATGGCGCATAGCAAAGCA		
EF-1α_fwd	TGAGATGCACCACGAAGCTC	EF-1α	
EF-1α_rvs	CCAACATTGTCACCAGGAAGTG		
Nt-23SrRNA_fwd	CCTGCTTTGTCAGGGTAAGA	23SrRNA	
Nt-23SrRNA_rvs	CAGGTACCCTCTTGCTCAAA		
Nt_18S_fwd	GGTGGAGCGATTTGTCTGGT	18S	
Nt_18S_rvs	CAGGCTGAGGTCTCGTTCGT		
Nt-pr1_fwd	CTAGTAATATCCCCTCTTGCCGT	PR1	für Analysen mit cDNA
Nt-pr1_rvs	GACTTTCGCCTCTATAATTACCTG		
Nt-pr2_fwd	ATGGCTTTATGCATTA AAAATGGC	PR2	
Nt-pr2_rvs	AGCATTGAAGACATTTGTTTCTGG		
Nt_PR10a(2)_fwd	GTGGGAGATTTCAAGCTCAA	PR10a	
Nt_PR10a(2)_rvs	TGAACATAGCCGAGACCTTC		
Nt_KCH1_fwd	CTTTGGATGTTGGGAATCTG	KCH1	
Nt_KCH1_rvs	AGTGGTCACTCAATGGGAAA		
Nt_tck1_fwd	TGGAAGGAACAAGCTGGTAG	TCK1	
Nt_tck1_rvs	TCACTCGTTCTACGCATTCA		

### 2.4.11 Methoden zum Nachweis von DNA-Fragmenten

Um das Verhältnis von untransformierten zu transformierten Kopien der pDNA in den Plastomtransformanten des Tabaks (2.2.3) zu ermitteln, wurde das *rps12*-Gen in aus Tabakblättern isolierter DNA nachgewiesen, welche mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut wurde. Das *rps12*-Gen liegt auf der pDNA direkt neben der in die Plastomtransformanten inserierten *WHIRLY1*-Genkassette. Die *WHIRLY1*-Genkassette besitzt eine Restriktionsstelle für *EcoRI*, wodurch sich nach Verdau mit diesem Enzym ein verändertes Bandenmuster bildet.

### 2.4.11.1 Kapillartransfer von DNA auf Membranen (Southern Blot)

DNA (2.4.5) aus Blättern der Plastomtransformanten des Tabaks (2.2.3) wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* hydrolysiert und auf einem Agarosegel (2.4.8) aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe von Standardprotokollen durch Kapillartransfer (Southern, 1975) auf positiv geladenen Nylonmembranen (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham, Braunschweig) transferiert. Als Transferlösung wurde 20 x SSC (2.4.1) verwendet. Die Fixierung auf der Membran erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht (*UV-Crosslinking*) mit einem UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

### 2.4.11.2 DNA-Sonde für das *rps12*-Gen

Für die Ermittlung des Verhältnisses von transformierten zu untransformierten Kopien der pDNA in den Plastomtransformanten des Tabaks wurde eine Sonde erstellt, die Teile des *rps12*-Gens des Tabaks umfasst. Die Sonde wurde mit Hilfe der Oligonukleotide *rps12\_fwd* (5'AGGTATCGGGAAGGATTTGG3') und *rps12\_rvs* (5'CATACGGCTCCTCGTTCAAT3') amplifiziert. Anschließend erfolgte die Markierung mit radioaktivem  $\alpha$ -32P-dCTP (Hartmann Analytic, Braunschweig) unter Verwendung des *Deca Label<sup>TM</sup> DNA Labeling Kits* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers. Die markierte Sonde wurde mittels einer *Spin-Column* von freien Nukleotiden getrennt und für die Hybridisierung verwendet (2.4.11.3).

### 2.4.11.3 Hybridisierung von DNA mit radioaktiv markierten Sonden

Die radioaktiv markierte Sonde für das *rps12*-Gen (2.4.11.2) wurde mit DNA hybridisiert, welche auf einer Membran immobilisiert war (2.4.11.1). Hierfür wurde zunächst die Membran auf die eigentliche Hybridisierung vorbereitet (Prähybridisierung), indem sie  $\bar{u}N$  bei 65 °C schwenkend in Denhardlösung inkubiert wurde, der 10  $\mu$ l/ml denaturiertes Heringssperma zugesetzt waren. Am nächsten Tag wurde die Membran in frischer Denhardlösung mit Heringssperma und der Sonde (2.4.11.3) wiederum  $\bar{u}N$  bei 65 °C inkubiert. Abschließend erfolgte das Abwaschen unspezifisch gebundener Sonden-DNA mit 2 x SSC (2.4.1), dem 0,1 % SDS zugesetzt waren. Weitere Waschschr tte mit 1 x SSC, 0,5 x SSC und 0,1 x SSC, dem jeweils 0,1 % SDS zugesetzt waren, wurden je nach Strahlung der Membran durchgeführt. Die Detektion der Signale erfolgte bei -80 °C auf Röntgenfilm (*High performance autoradiography film*; Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Denhardlösung:	250 ml/l	20 x SSC
	50 ml/l	100 x Denhard
	25 ml/l	20 % SDS

### 2.4.12 Isolierung und Aufreinigung von RNA

RNA wurde jeweils aus Organen von *A. thaliana* (2.4.12.1) und von *N. tabacum* (2.4.12.2) isoliert und aufgereinigt.

#### 2.4.12.1 Isolierung von RNA aus Organen von *Arabidopsis thaliana*

Für die Extraktion von RNA aus Organen von *A. thaliana* wurde die Methode nach Sambrook et al. (1989) verwendet.

Gefrorenes, gemörstertes Material wurde bis zur 0,5 ml Marke in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt und mit 800 µl Boratpuffer (auf 65 °C erhitzt) und 600 µl Phenol gründlich mit Hilfe eines Vortexgerätes (MS2 Minishaker, IKA Labortechnik, Staufen) vermischt. Nach einer 20-minütigen Inkubation unter Schütteln bei 30 °C im Heizblock (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg) wurden die wässrige Phase und die organische Phase durch Zentrifugation für 10 min bei 16100 x g (Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg) getrennt. Die wässrige Phase (oben) wurde abgenommen, mit 300 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und 300 µl Phenol versetzt, mit einem Vortexgerät gründlich vermischt und anschließend für 10 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die durch 10- bis 20-minütige Zentrifugation bei 16100 x g entstandene wässrige Phase wurde erneut mit 600 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vermischt, um letzte Verunreinigungen durch Proteine zu entfernen. Nach einer 10-minütigen Inkubation unter Schütteln bei 30 °C wurde die RNA aus der wässrigen Phase gefällt, indem 6 M LiCl bis zu einer Konzentration von 2 M LiCl zugegeben wurden. Die Fällung erfolgte bei 4 °C üN. Am nächsten Tag wurde durch Zentrifugation bei 16100 x g für 15 min die RNA pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % EtOH gewaschen, 5 bis 10 min getrocknet und anschließend in sterilem Wasser resuspendiert.

Boratpuffer:	0,2 M	Natriumtetraborat
	1 % (w/v)	SDS
	30 mM	EDTA

#### 2.4.12.2 Isolierung von RNA aus *Nicotiana tabacum*

Mit Hilfe des Trifast-Reagenz (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) wurde RNA aus Blättern von *N. tabacum* isoliert. Es wurden etwa 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörstert, mit 1 ml Trifast-Reagenz gründlich vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch 8-minütige Zentrifugation bei 12000 x g (Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg) wurde der Zellbruch abgetrennt und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Lösung enthielt neben der RNA noch Proteine, DNA und andere Verunreinigungen, so dass eine weitere Aufreinigung mit dem *Direct-zol<sup>TM</sup> RNA MiniPrep Kit* der

Firma Zymo Research (Irvine, CA, USA) nötig war. Hierfür wurde zunächst die RNA-Lösung mit 1 x Vol. EtOH versetzt und mit Hilfe eines Vortexgerätes (MS2 Minishaker, IKA Labortechnik, Staufen) gründlich vermischt. Anschließend pipettierte man die Lösung auf ein *Zymo-Spin II C* Säulchen, welches bei 1200 x g für 1 min zentrifugiert wurde. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 400 µl *PreWash* Lösung und einmaligem Waschen mit 700 µl *RNA Wash Buffer* wurde das Säulchen durch Zentrifugation bei 12000 x g für 2 min getrocknet. Die an das Säulchen gebundene, gereinigte RNA wurde schließlich mit 30 µl sterilem Wasser durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min gelöst.

### 2.4.13 5'RLM-RACE

Für die Durchführung einer 5'RLM-RACE Analyse (*RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA ends*) wurde der *First Choice® RLM-RACE* Kit der Firma Ambion (Life Technologies, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Sequenzen der genspezifischen Primer sind in Tab. M4 aufgeführt. Die Durchführung des 5'RLM-RACE ist in Abb. M1 schematisch dargestellt.

RNA aus Rosettenblättern von drei bis zwölf Wochen alten Pflanzen des Wildtyps von *A. thaliana* wurde mit CIP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*) behandelt um freie 5'-Phosphate von rRNA, fragmentierter RNA, tRNA und genomischer DNA zu entfernen (Abb. M1). Die 5'Cap-Struktur intakter mRNA wird durch diese Behandlung nicht beeinträchtigt. Anschließend wird die RNA mit *Tabak Acid Pyrophosphatase* versetzt, so dass die 5'Cap-Struktur von intakter mRNA entfernt wird und ein 5'Monophosphat zurückbleibt. Mit Hilfe der T4-RNA-Ligase wird an dieses Monophosphat ein 45 Basenpaar langes *RNA Adapter* Oligonukleotid ligiert (Abb. M1). Dabei ist es dem Adapter unmöglich, an dephosphorylierte RNA zu binden, da diesen Molekülen das benötigte 5'Phosphat fehlt. Somit wurden ausschließlich komplette mRNA-Fragmente mit einem Adapter am Transkriptionsstart markiert. Eine reverse Transkription und eine anschließende PCR mit Oligonukleotiden spezifisch für den Adapter und spezifisch für das 3'Ende des jeweiligen *WHIRLY*-Gens, führt zur Vervielfältigung spezifischer Transkripte.

Tab. M4: Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Durchführung der 5'RLM-RACE Analyse verwendet wurden. Die Sequenzen sind jeweils in 5' - 3' Richtung angegeben.

Name	Sequenz	Gen	Gen#
Atwhy1-gs-outer	TCATCTATTCCATTCATAGTCT	WHIRLY1	At1g14410
Atwhy1-gs-inner	TCCATAGTTAGGCGAAGCGTT		
Atwhy2-gs-outer	ATCATTTTCATTTATCCCCTCCA	WHIRLY2	At1g71260
Atwhy2-gs-inner	AATTTACTCCGTTCTACTACT		
Atwhy3-gs-outer	TCATCTACTCCATTCGTAGTCT	WHIRLY3	At2g02740
Atwhy3-gs-inner	ATACTTAGGCGAAGCATTGTAA		

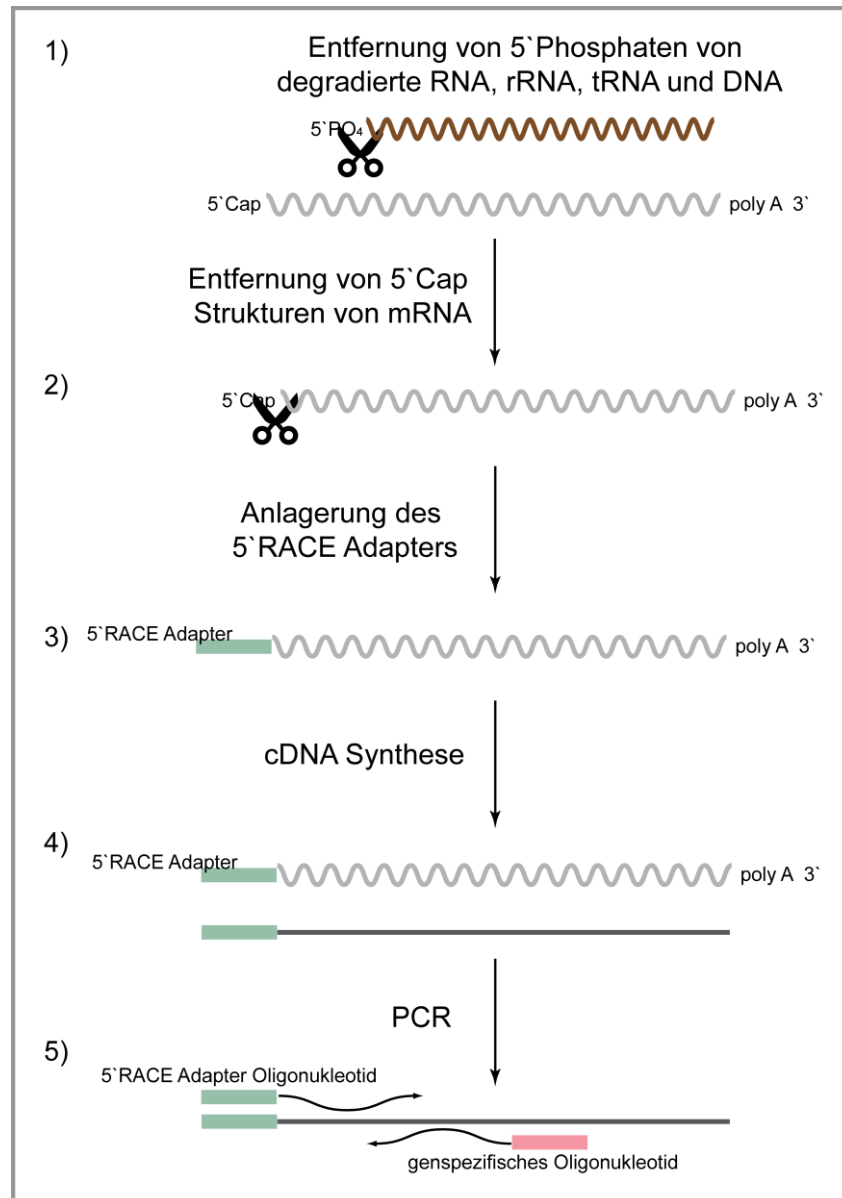


Abb. M1: Schematische Darstellung einer 5'RLM-RACE Analyse (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA ends). 1) Freie 5'-Phosphate werden von rRNA, fragmentierter RNA, tRNA und genomischer DNA entfernt. 2) Anschließend wird die 5'Cap-Struktur von intakter mRNA entfernt, wobei ein 5'Monophosphat zurückbleibt, 3) an das ein *RNA Adapter* Oligonukleotid ligiert wird. 4) Eine reverse Transkription mit *Random Primern* und 5) eine anschließende PCR mit adapter- und genspezifischen Oligonukleotiden führt zur Vervielfältigung des spezifischen Transkripts.

### 2.4.14 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Die subzelluläre Lokalisierung von GFP-, RFP- und YFP-Fusionsproteinen in stabil transformierten Linien von *A. thaliana* wurde mit dem Konfokalmikroskop (CLSM, *confocal laser scanning microscope*) TCS SP5 der Firma Leica Microsystems (Wetzlar) analysiert. Etwa 1 cm<sup>2</sup> große Blattsegmente wurden in 1 x PBS (2.4.1) mikroskopiert. Die Aufnahme der Bilder sowie die Auswertung der Daten erfolgte mit

der LAS AF Lite Software (Leica Microsystems, Wetzlar). Für alle Aufnahmen wurde das Objektiv HCX PL APO CS 63.0 x 1.40 OIL verwendet. Es wurde ein sequentieller Scan durchgeführt. Der Laser und der Detektor (Photomultiplier, PMT) wurden für die Detektion der verschiedenen Fluorophore wie folgt eingestellt:

GFP: Anregung: Argonlaser (30%) mit  $\lambda = 488$  nm (14%), Detektion: 500-556 nm  
RFP: Anregung: Argonlaser (28%) mit  $\lambda = 543$  nm (60%), Detektion: 555-624 nm  
YFP: Anregung: Argonlaser (30%) mit  $\lambda = 514$  nm (31%), Detektion: 525-561 nm  
Chlorophyll: Anregung: Argonlaser (30%) mit  $\lambda = 633$  nm (18%),  
Detektion: 650-730 nm

## 2.5 Allgemeine proteinbiochemische Analysen

### 2.5.1 Isolierung von Gesamtprotein aus Pflanzenmaterial

Zur Isolierung von Gesamtprotein wurden 200 mg gefrorenes, gemörseretes Pflanzenmaterial mit 1 ml Proteinextraktionspuffer versetzt und mit Hilfe eines Vortexgerätes (MS2 Minishaker, IKA Labortechnik, Staufen) gründlich vermischt. Nach Extraktion der Proteine für 5 min bei 95 °C im Heizblock (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg) wurden die Proben auf RT abgekühlt und anschließend für 15 min bei 12000 x g zentrifugiert (Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand enthielt die gesamten Proteine der Zelle und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Proteinextraktionspuffer:	62,5 mM	Tris pH 6,8
	10 % (v/v)	Glyzerin
	3 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	1 % (w/v)	SDS

### 2.5.2 Methoden zur Isolierung und Fraktionierung von Chloroplasten

Chloroplasten wurden aus Blattmaterial von *A. thaliana* (2.5.2.1) und von *N. tabacum* (2.5.2.2) mit jeweils unterschiedlichen Methoden isoliert.

#### 2.5.2.1 Chloroplastenisolierung aus Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolierung von intakten Chloroplasten aus Rosettenblätter von *A. thaliana* wurde die Methode nach Gruissem et al. (1986) verwendet. Es wurden 10 g Blattmaterial

## 2. Material und Methoden

mit 200 ml GM-Puffer im *Waring Blendor* homogenisiert (1 x 2 sek *low*, 3 x 2 sek *high*). Grobe Zellbestandteile wurden durch Filtration über vier Lagen Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, USA) abgetrennt. Das Filtrat wurde für 30 sek bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert (Centricon T-124, KONTRON Instruments, Rossdorf). Das Sediment wurde mit Hilfe eines Pinsels in wenig GM-Puffer vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde auf einen zweistufigen Percollgradienten gegeben und zentrifugiert (20 min, 7000 x g, 4 °C). Die intakten Plastiden, die sich auf dem unteren, höher prozentigen Percollkissen befanden, wurden abgenommen und im Verhältnis 1:1 mit Waschmedium versetzt und zentrifugiert (2 min, 7000 x g, 4 °C). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Plastiden in wenig GM-Puffer resuspendiert.

5 x GM-Puffer:	1,65 M	Sorbitol
	250 mM	HEPES
	2 M	EDTA
	1 M	Magnesiumchlorid
	1 M	Manganchlorid
	1 M	(tetra)-Natriumpyrophosphat pH 6,8 mit NaOH einstellen

1 x GM-Puffer:	100 ml	5 x GM
	400 ml	Wasser
	1 ml	1 M DTT
stets frisch vor Gebrauch ansetzen		

Percollgradient:	80 %, 40 %, 30 % (v/v)	PCBF
	330 mM	Sorbit
	2 mM	EDTA
	1 mM	Magnesiumchlorid
	2 mM	DTT
	0,017 % (w/v)	Glutathion
	50 mM	HEPES/KOH, pH 8,0
PCBF:	3 % (w/v)	PEG (MW 6000)
	1 % (w/v)	BSA
	1 % (w/v)	Ficoll
in Percoll lösen		

Waschmedium:	330 mM	Sorbit
	50 mM	HEPES/KOH, pH 8,0



### 2.5.2.2 Chloroplastenisolierung aus Blättern von *Nicotiana tabacum*

Zur Isolierung von intakten Chloroplasten aus Blättern von *N. tabacum* wurden 30 bis 50 g frisches Blattmaterial mit 200 ml kaltem Isolierungsmedium im *Waring Blendor* homogenisiert (1 x 4 sek *low*, 3 x 2 sek *high*). Grobe Zellbestandteile wurden mittels Filtration durch vier Lagen Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, USA) abgetrennt. Das Filtrat wurde für 1 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg). Das Sediment wurde mit Hilfe eines Pinsels in wenig Waschmedium resuspendiert. Die Suspension wurde auf einen zweistufigen Percollgradienten gegeben und zentrifugiert (25 min, 5000 rpm, 4 °C). Die intakten Chloroplasten, die sich auf dem unteren, höher prozentigen Percollkissen befanden, wurden abgenommen und mit 2 x Vol. Waschmedium versetzt und zentrifugiert (1 min, 7000 rpm, 4 °C). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Plastiden in wenig Waschmedium resuspendiert.

Isolierungsmedium:	0,33 M	Sorbitol
	4 mM	Natriumascorbat
	1,2 mM	MgCl <sub>2</sub>
	4 mM	EDTA
	1 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	4 mM	DTT
	0,2% (w/v)	BSA
	0,1% (w/v)	PVP10
	25 mM	MES
	25 mM	HEPES/KOH pH 6,8
Waschmedium:	0,33 M	Sorbitol
	50 mM	HEPES/KOH pH 8
Gradientenlösungen:	50 mM	Hepes KOH pH 8
	0,33 M	Sorbitol
	40% bzw. 80% (v/v)	Percoll

### 2.5.2.3 Fraktionierung von Chloroplasten

Um Plastidenmembranen und Stroma getrennt untersuchen zu können, erfolgte eine Fraktionierung von Chloroplasten, die zuvor aus Blättern von *A. thaliana* isoliert wurden (2.5.2.1). Die Chloroplasten wurden in Lysispuffer aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bei 50000 x g bei 4 °C für 20 min pelletiert (Optima™ L-90 K Ultracentrifuge, Beckmann Coulter, Krefeld). Das Pellet enthielt die Thylakoidmembranen und die plastidären Hüllmembranen. Der Überstand, der Stromaproteine enthielt, wurde gefällt.

Lysispuffer:	10 mM	HEPES/KOH pH 7.6
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>

### 2.5.3 Anreicherung von Mitochondrien aus Blättern von *Arabidopsis thaliana*

Zur Anreicherung von Mitochondrien aus Blättern von *A. thaliana* wurden 5 g Blattmaterial in 30 ml Medium A fein zerschnitten und das Homogenat anschließend durch Nylongaze mit einem Durchmesser von 20 µm filtriert. Anschließend erfolgte eine Differentialzentrifugation bei 4 °C (Centrikon T-124; KONTRON Instruments, Rossdorf). Hierfür wurde das Homogenat zunächst bei 2500 x g für 5 min sedimentiert, das Pellet verworfen und der Überstand erneut für 5 min bei 2500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann bei 8000 x g für 5 min zentrifugiert, das Pellet verworfen und aus dem Überstand wurden die Mitochondrien durch eine Zentrifugation bei 15000 x g abgetrennt. Das Pellet wurde vorsichtig in 1 bis 2 ml Waschmedium A gelöst und auf einen Gradienten geschichtet. Für die Herstellung des Gradienten wurden eine 52 %ige und eine 20 %ige Saccharoselösung in Waschmedium A hergestellt, übereinander geschichtet und für mindestens 2 Std. bei 4 °C gelagert. Der Gradient wurde für 4 Std. bei 24000 rpm im TST28.38-Rotor der Optima™ L-90 K Ultracentrifuge (Beckmann Coulter, Krefeld) bei 4 °C zentrifugiert. Die Bande zwischen den beiden Gradientenlösungen enthielt die Mitochondrien und wurde abgenommen und mit mindestens 3 x Vol. Waschmedium A verdünnt. Durch eine Zentrifugation bei 15000 x g und 4 °C für 15 min (Centrikon T-124; KONTRON Instruments, Rossdorf) erfolgte die Sedimentierung der Mitochondrien, welche abschließend in 1 bis 2 ml Waschmedium A aufgenommen wurden.

Medium A:	0,3 M	Saccharose
	60 mM	MES
	10 mM	EDTA
	25 mM	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
	10 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1 mM	Glycin
	1 % (w/v)	PVP-40
	1 % (w/v)	BSA
	50 mM	Na-Ascorbat
	20 mM	Cystein
		pH 8 einstellen

Waschmedium A:	0,3 M	Saccharose
	10 mM	MES
	2 mM	EDTA
	10 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		pH 7,5 einstellen

### 2.5.4 Isolierung von Zellkernen aus Blättern von *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung von Zellkernen aus Blattmaterial von *A. thaliana* erfolgte nach Kanazawa et al. (2000). Zehn g des gefrorenen, gemörserten Blattmaterials wurden mit 40 ml Isolationsmedium I versetzt und gründlich vermischt. Anschließend erfolgte eine Filtration durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Jeweils 10 ml des Filtrats wurden auf ein 5 ml Saccharosekissen geschichtet und für 20 min bei 1800 x g und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurde die Schicht auf dem Saccharosekissen abgenommen und mit 3 x Vol. Isolationsmedium II gründlich vermischt. Durch 30-minütiges Schwenken auf Eis erfolgte die Zerstörung der Chloroplasten. Die Zellkerne wurden anschließend durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 1800 x g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde mehrmals mit Isolationsmedium II gewaschen, bis es nicht mehr grün war.

Isolationsmedium I und II:	1,14 M	Saccharose
	10 mM	Tris/HCl, pH 7,6
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,1 mM	PMSF
	1,1 mM	Phenanthrolin Monohydrat
	0,1 % (v/v)	Thyodiglycol

Für das Isolationsmedium II wird noch 0,15 % Triton X-100 hinzugefügt.

Saccharosekissen:	2 M	Saccharose
	10 mM	Tris/HCl, pH 7,6
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>

### 2.5.5 Isolierung von Zellkernen aus Blättern von *Nicotiana tabacum*

Die Isolierung von Zellkernen aus Blättern von *N. tabacum* erfolgte nach Busk und Pagès (1997). Etwa 100 mg gemörsertes, gefrorenes Blattmaterial wurden mit 1 ml Puffer A versetzt und mit Hilfe eines Vortexgerätes (MS2 Minishaker, IKA Labortechnik, Staufen) für 30 sek gründlich vermischt. Das Homogenat wurde anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß ohne Boden gegeben, welches in ein 15 ml Reaktionsgefäß eingesetzt wurde. Zwischen den beiden Reaktionsgefäßen befanden sich zwei Lagen Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 3000 x g und 4 °C (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg) wurden die Zellkerne am Boden des 15 ml Reaktionsgefäßes sedimentiert und von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Das Pellet wurde in 400 µl Puffer A resuspendiert und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 2000 x g und 4 °C für 10 min. Das Pellet wurde abschließend so oft mit Puffer A gewaschen, bis es nicht mehr grün war.

Puffer A:	10 mM	HEPES pH 7,8
	10 mM	KCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	5 mM	EDTA
	0,5 % (v/v)	Triton X-100
	250 mM	Saccharose
	1 mM	DTT
	0,2 mM	PMSF
	DTT und PMSF frisch zugeben	

### 2.5.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) ermittelt.

Bis zu 10 µl des Proteinextraktes wurden auf 800 µl mit deionisiertem Wasser aufgefüllt und mit 200 µl des Farbstoffkonzentrates BIO-RAD Protein Assay versetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm (Spektralphotometer UV-2501 PC, Shimadzu, China). Weiterhin wurde eine BSA-Eichreihe erstellt, die zur Berechnung der Proteinkonzentration diente.

### 2.5.7 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die denaturierende Auftrennung von Proteinen erfolgte in einem SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970). Entsprechend des Molekulargewichtes der zu untersuchenden Proteine wurde ein 12 bis 14 %iges (w/v) Trenngel verwendet. Die Gele wurden entsprechend der folgenden Tabelle erstellt:

<u>Stammlösung</u>	<u>10 ml Sammelgel</u>	<u>10 ml Trenngel</u>
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	1,5 ml	x ml
1 M Tris/HCl pH 6,8	2,5 ml	-
1 M Tris/HCl pH 8,8	-	3,8 ml
20 % SDS	50 µl	50 µl
10 % APS	100 µl	50 µl
TEMED	16 µl	5 µl
H <sub>2</sub> O	6 ml	x ml

Proteinproben wurden mit 1 x PSB-Puffer versetzt, für 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 20 bis 30 mA in 1 x Puffer nach Laemmli. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde der Marker *Prestained-Protein-Ladder* (10-170 kDa, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

## 2. Material und Methoden

---

2 x PSB:	100 mM	Tris/HCl pH 6,8
	100 mM	DTT
	20 % (v/v)	Glycerin
	4 % (w/v)	SDS
	0,2 % (w/v)	Bromphenolblau

10 x Puffer nach Laemmli:	250 mM	Tris/HCl pH 6,8
	1,9 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS

Zur besseren Auftrennung von kleinen Proteinen wurde eine modifizierte SDS-PAGE durchgeführt (Fling und Gregerson, 1986). Für die Proteinauftrennung wurden SDS-haltige *High-Tris*-Trenngele mit 14 % (w/v) Acrylamid verwendet. Es wurde ein 5 %iges (w/v) Acrylamid-Sammelgel benutzt.

5 x High-Tris-Puffer:	160 mM	Tris/HCl pH 6,8
	5,5 % (w/v)	SDS
	30 % (v/v)	Glycerin
	0,5 % (w/v)	Bromphenolblau
	19 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	3 M	Harnstoff
10 x High-Tris-Laufpuffer:	60,6 g/l	Tris
	142,8 g/l	Glycin
	1 % (w/v)	SDS
		pH 8,5 mit HCl einstellen

### 2.5.8 Färbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen mit Coomassie-Brillantblau

Mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie-Brillantblau können Proteine angefärbt werden. Die PA-Gele (2.5.7) wurden für mindestens 1 Std. in der Färbelösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung mit Färbelösung ohne Coomassie, bis klare Proteinbanden erkennbar waren.

Färbelösung:	25 % (v/v)	Isopropanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	0,1 % (w/v)	Coomassie-Brillantblau

### 2.5.9 Methoden zur Immundetektion von Proteinen

Zur Immundetektion von Proteinen wurden Proteinproben zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.5.7), anschließend auf Trägermembranen transferiert (2.5.9.1), welche abschließend mit spezifischen Antikörpern (2.5.9.2) behandelt wurden (2.5.9.3).

#### 2.5.9.1 Proteintransfer auf Trägermembranen (Western Blot)

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine (2.5.7) wurden auf einer Nitrocellulosemembran (Roti®-NC, Porengröße 0,2 µm, Roth, Karlsruhe) immobilisiert. Dafür wurden sechs Whatman Filterpapiere (Schleicher und Schuell, Dassel) sowie die Membran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die Filterpapiere, die Membran und das Gel wurden im Transferpuffer getränkt. Für den Transfer auf die Membran wurden auf die Anode der Blottingapparatur (Fastblot B44; Biometra, Göttingen) drei Lagen Filterpapier, dann die Membran und anschließend das PA-Gel sowie der Kathode zugewandt wieder drei Lagen Filterpapier geschichtet. Für den Proteintransfer wurde eine Stromstärke von 2 mA/cm<sup>2</sup> für 40 min angelegt.

Transferpuffer:     2,93 g/l     Glycin  
                          5,81 g/l     Tris  
                          0,375 g/l     SDS  
                          200 ml/l     Methanol

#### 2.5.9.2 Liste der verwendeten Antikörper

In der folgenden Tabelle sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper mit den zugehörigen Sekundärantikörpern aufgelistet. Zusätzlich wird angegeben, wie die Antikörper jeweils verdünnt wurden.

Tab. M5: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung	Herkunft
α-Cytochrom b <sub>559</sub>	1:2.000	α-Maus	1:50.000	Vallon et al., 1987
α-H <sub>2</sub> B Histon	1:1.000	α-Kaninchen	1:5.000	Cell Signaling Technology, Denvars, MA, USA
α-Pol I	1:2.000	α-Kaninchen	1:100.000	Agrisera
α-HA-Tag	1:4.000	α-Ratte	1:100.000	Roche
α-WHIRLY3	1:500	α-Kaninchen	1:50.000	
α-TOC75	1:5.000	α-Kaninchen	1:50.000	Agrisera

### 2.5.9.3 Immundetektion

Nach Immobilisierung der Proteine (2.5.9.1) wurden die Membranen zur Blockierung unspezifischer Bindestellen in einer 2 %igen Blockierungslösung (*ECL Advance™ blocking agent*, GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK), welche in 1 x TBS angesetzt wurde, für 2 bis 5 Std. bei RT inkubiert. Nach anschließendem Waschen mit 1 x TBST (zweimal kurz spülen, einmal 15 min schwenken, zweimal 5 min schwenken) wurden die Membranen mit dem jeweiligen Primärantikörper (2.5.9.2), der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet war und in 1 x TBS verdünnt wurde, bei 4 °C üN inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen mit 1 x TBST gewaschen (zweimal kurz spülen, einmal 15 min schwenken, zweimal 5 min schwenken). Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation bei RT mit einem Sekundärantikörper, der den jeweiligen Primärantikörper bindet (2.5.9.2) und in 1 x TBS verdünnt wurde. Der Sekundärantikörper war mit einer Peroxidase gekoppelt, wodurch ein Nachweis mittels Chemilumineszenz ermöglicht wurde. Nach erneutem Waschen mit 1 x TBST (zweimal kurz spülen, dreimal 15 min schwenken) erfolgte der Nachweis des Protein-Antikörper-Komplexes entweder mit Hilfe des *LuminogenTMTMA-6 Kits* (Amersham GE Healthcare, UK) oder des *SuperSignal®WestPico Chemiluminescent Substrate Kits* (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) nach Angaben des Herstellers. Die Peroxidaseaktivität wurde in einer ECL-Kassette durch Auflegen eines Films (*HyperfilmTMECL High performance chemiluminescence film*, Amersham Bio Sciences, Buckinghamshire, England) detektiert. Der Film wurde in Entwickler inkubiert, bis deutlich erkennbare Banden erschienen. Daraufhin wurde der Film kurz in Leitungswasser geschwenkt und dann für 10 min fixiert. Entwickler und Fixierer stammten von der Firma Tetenal (Norderstedt).

10 x TBS(T):	12,1 g/l	Tris
	87,66 g/l	NaCl
	(5 g/l	Tween 20)

### 2.5.9.4 Entfernen von gebundenem Antikörper von der Trägermembran

Sollte eine Membran, auf der Proteine immobilisiert waren (2.5.9.1), nach erfolgter Immundetektion (2.5.9.3) für einen erneuten Nachweis mit Hilfe von Antikörpern verwendet werden, mussten neben der Detektionslösung die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper entfernt werden. Dafür wurde die Membran für 3 min in 0,4 M NaOH mit 0,1 % (w/v) SDS geschwenkt.

### 2.5.9.5 Aufreinigung und Analyse des WHIRLY3-Peptidantikörpers

Die Aufreinigung des WHIRLY3-Peptidantikörpers erfolgte mit Hilfe des *SulfoLink®* Kits (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) nach Angaben des Herstellers.

Zur Charakterisierung von  $\alpha$ -WHIRLY3 wurden *Dot-Blot* Teststreifen angefertigt. Dafür wurden auf eine Nitrocellulosemembran (Roti®-NC, Porengröße 0,2  $\mu$ m; Roth, Karlsruhe) verschiedene Mengen an WHIRLY3-Peptid (1  $\mu$ g, 100 ng, 10 ng, 1 ng und 0,1 ng) aufgebracht. Dies erfolgte mit Hilfe einer Dot-Blot-Apparatur (SRC 96 D Minifold I, Schleicher & Schuell). In die Auftragslöcher wurden zuerst 200  $\mu$ l 1 x PBS (modifiziert) gegeben, die Lösung wurde mit Hilfe eines Vakuums durch die angefeuchtete Membran und das darunter liegende Whatman-Filterpapier gesaugt. Daraufhin wurden das Peptid aufgetragen und mit 200  $\mu$ l 1 x PBS Puffer (modifiziert) nachgewaschen. Die Membran wurde getrocknet. Die Immundetektion erfolgte wie beschrieben (2.5.9.3).

10 x PBS (modifiziert):	150 mM	NaCl
	8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		pH 7,4

### 2.5.10 Koimmunpräzipitation

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern des WHIRLY3-Proteins von *A. thaliana* wurde eine Koimmunpräzipitation mit  $\alpha$ -WHIRLY3 durchgeführt. Hierfür wurden zunächst Chloroplasten aus Keimlingen des Wildtyps isoliert. Die intakten Chloroplasten wurden lysiert und die Chloroplastenproteine für die Durchführung der Koimmunpräzipitation eingesetzt.

#### 2.5.10.1 Isolierung von Chloroplastenproteinen

Die Isolierung von intakten Chloroplasten erfolgte nach der Methode von Aronsson und Jarvis (2011). Als Ausgangsmaterial dienten zwei Wochen alte Keimlinge des Wildtyps von *A. thaliana*, die auf agarhaltigem MS-Medium angezogen wurden. Die frisch geernteten Keimlinge wurden in einer kleinen Menge 1 x Isolationspuffer homogenisiert, indem man sie für 3 sek mit einem Stabmixer zerkleinerte. Anschließend wurde das Homogenat durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, USA) gefiltert und die zerkleinerten Keimlinge erneut in Isolationspuffer mit dem Stabmixer homogenisiert. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Das Filtrat wurde bei 1000 x g für 6 min pelletiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 0,5 bis 2 ml Isolationspuffer gelöst.

Durch Vermischen von 2 x Isolationspuffer mit Percoll im Verhältnis 1:1 wurde die Gradientenlösung erstellt, welcher eine Spatelspitze Glutathion zugesetzt wurde. Ein kontinuierlicher Gradient bildete sich durch eine 30-minütige Zentrifugation der Gradientenlösung bei 60000 x g ohne Bremse. Auf diesen Gradienten wurde das resuspendierte Pellet gegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 7.800 x g und 4 °C ohne Bremse, wodurch sich zwei distinkte Banden im Gradienten



bildeten. Die untere Bande, die die intakten Chloroplasten enthielt, wurde abgenommen und mit der dreifachen Menge HS-Puffer versetzt. Durch eine abschließende 5-minütige Zentrifugation bei 1000 x g wurden die intakten Chloroplasten gewaschen und anschließend in einer kleinen Menge HS-Puffer aufgenommen.

Anschließend erfolgte der osmotische Aufbruch der intakten Chloroplasten. Hierfür wurde die Chloroplastensuspension mit ½ x Vol. Lysispuffer, 1 % Digitonin und 1 mM PMSF gründlich vermischt mit Hilfe eines Vortexgerätes und für zehn bis 20 min auf Eis geschüttelt. Während dieser Inkubation wurden die Chloroplasten zusätzlich mechanisch zerstört, indem die Suspension einige Male mit einer Spritze angesaugt wurde. Durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C wurden grobe Bruchstücke der Chloroplasten pelletiert. Der Überstand, der die Chloroplastenproteine enthielt, fand seinen Einsatz in der Koimmunpräzipitation (2.5.10.2).

2 x Isolationspuffer:	0,6 M	Sorbitol
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	EGTA
	10 mM	EDTA
	40 mM	HEPES
	20 mM	NaHCO <sub>3</sub>
		mit KOH pH 8 einstellen

HS-Puffer:	0,6 M	Sorbitol
	50 mM	HEPES
		mit KOH pH 8 einstellen

Lysispuffer:	10 M	HEPES-KOH, pH 7,9
	0,25 M	KCl

### 2.5.10.2 Durchführung einer Koimmunpräzipitation

Das Prinzip der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Koimmunpräzipitation mit  $\alpha$ -WHIRLY3 ist in Abb. M3 schematisch dargestellt.

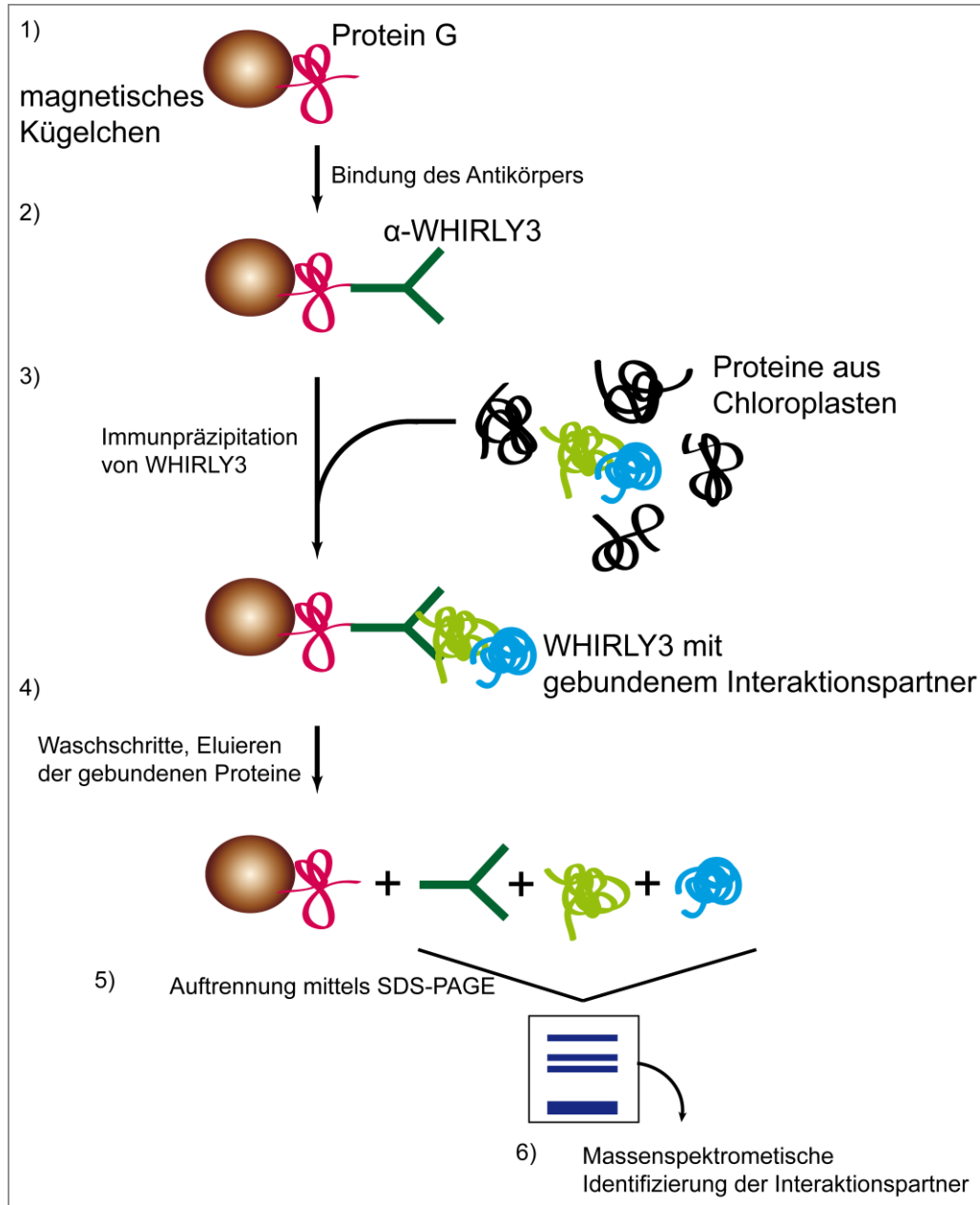


Abb. M3: Schematische Darstellung der Koimmunpräzipitation mit  $\alpha$ -WHIRLY3. 1) Rekombinantes Protein-G wurde an magnetische Kügelchen (*magnetic beads*; Dynabeads®) gekoppelt. 2) Das Protein-G ist in der Lage,  $\alpha$ -WHIRLY3 über dessen schwere Ketten zu binden und somit an den Kügelchen zu fixieren. 3) Chloroplastenproteine wurden mit den magnetischen Kügelchen inkubiert, wodurch das WHIRLY3-Protein vom Antikörper gebunden wurde. Assoziierte Interaktionspartner banden somit ebenfalls an die Kügelchen. 4) Nach einigen Waschschritten zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurden die Proteine von den Kügelchen gelöst und 5) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie-Brillantblau eingefärbt. 6) Abschließend erfolgte die Untersuchung der resultierenden Banden mittels Massenspektrometrie.

Die Koimmunpräzipitation wurde mit dem *Immunoprecipitation Kit – Dynabeads® Protein G* (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Hierfür wurden zunächst 50 µl magnetische Kügelchen in einem Reaktionsgefäß in einen Magnetständer (*Dyna-Mag 2*, Invitrogen, Karlsruhe) eingestellt, wodurch die Kügelchen pelletierten. Der Überstand wurde abgenommen und die Kügelchen mit 10 µg α-WHIRLY3 bzw. des entsprechenden Präimmunserums und 200 µl PBS + T (0,02 % Tween 20, pH 7,4) versetzt. Die Bindung des Antikörpers an das Protein-G erfolgte bei einer 10-minütigen Inkubation im Überkopfschüttler bei RT. Danach wurde das Reaktionsgefäß in den Magnetständer eingestellt und der Überstand entfernt. Die Kügelchen wurden mit 200 µl PBS + T gewaschen. Bei der anschließenden 10-minütigen Inkubation der Kügelchen mit Chloroplastenproteinen (2.5.10.1) wurde das WHIRLY3-Protein zusammen mit assoziierten Interaktionspartnern vom Antikörper erkannt, gebunden und somit auch an die Kügelchen angeheftet (Abb. M3). Die Inkubation erfolgte in einem Überkopfschüttler bei RT. Danach wurde das Reaktionsgefäß in den Magnetständer eingestellt, der Überstand entfernt und die Kügelchen dreimal mit 200 µl PBS + T gewaschen, um unspezifische Bindungen zu lösen. Die Kügelchen wurden in 100 µl PBS gelöst und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, welches in den Magnetständer eingesetzt wurde. Der Überstand wurde entfernt und die Kügelchen wurden in 20 µl PSB (2.5.7) aufgenommen. Durch eine Inkubation bei 70 °C für 10 min wurde das an die magnetischen Kügelchen gebundene Proteingemisch eluiert und anschließend mittels SDS-PAGE (2.5.7) aufgetrennt. Das Gel wurde abschließend mit Coomassie-Brillantblau eingefärbt (2.5.8), um die Banden der isolierten Interaktionspartner sichtbar zu machen. Die in ausgewählten Banden enthaltenen Proteine wurden mittels MALDI-TOF massenspektrometrisch identifiziert (durchgeführt durch Proteomics Core Facility, Universität Göteborg, Schweden). Es wurde die UniprotKB Datenbank ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) für die Identifizierung von Proteinen genutzt.

### 2.6 Hefe-2-Hybridsystem

Beim Hefe-2-Hybridsystem erfolgt die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion in einer *in vivo*-ähnlichen Umgebung, d.h. in einer eukaryotischen Zelle (*Saccharomyces cerevisiae*) mit den dort vorkommenden post-translationalen Modifikationen. Das Hefe-2-Hybridsystem basiert dabei auf der aktivierenden Wirkung des GAL4-Transkriptionsfaktors. GAL4 gliedert sich in zwei funktionelle Domänen, die DNA-Bindedomäne und die Aktivierungsdomäne. Trennt man die Domänen, so verliert GAL4 seine Funktionalität als Transkriptionsaktivator (Fields und Song, 1989).

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern des WHIRLY3-Proteins wurde das Protein mit der GAL4-DNA-Bindedomäne fusioniert (Abb. M4). Mit diesem sogenannten *Bait*-Protein (*bait* engl. für Köder) wurde eine cDNA-Bank durchmustert, welche Proteine von *A. thaliana* als Fusionsproteine mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (*Prey*-Proteine; *prey* engl. für Beute) kodiert. Kommt es nun zu einer Interaktion zwischen WHIRLY3 und einem *Prey*-Protein, werden dabei die DNA-Bindedomäne

und die Aktivierungsdomäne zusammengebracht und der GAL4-Transkriptionsfaktor kann die Transkription einer Reporterengenkassette aktivieren (Abb. M4). Durch die Aktivierung der Reportergene können Hefekolonien auf Minimalmedium wachsen bzw. eine Blaufärbung der Kolonien bei einem X-Gal-Assay kann beobachtet werden. Anschließend kann der mögliche WHIRLY3-Interaktionspartner durch Sequenzierung der im cDNA-Bank Vektor enthaltenen Sequenz identifiziert werden.

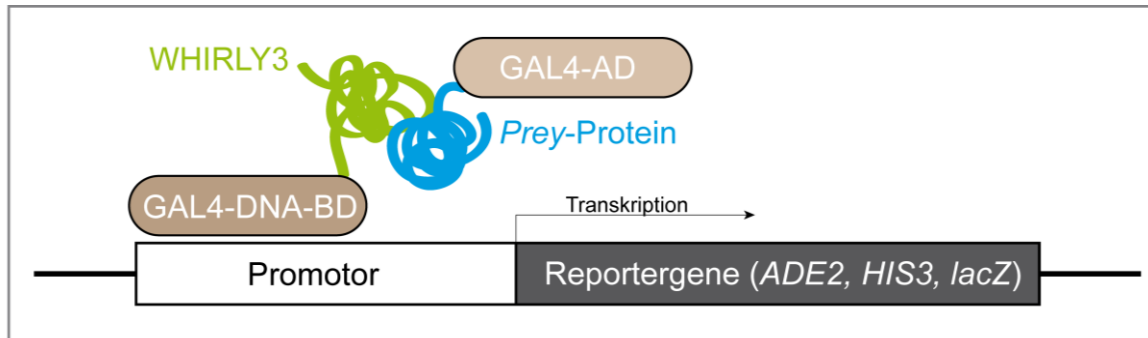


Abb. M4: Schematische Darstellung des Hefe-2-Hybridsystems. Das WHIRLY3-Protein wird in Fusion mit der DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsaktivators (GAL4-DNA-BD) synthetisiert. Die Genfragmente einer cDNA-Bank in *S. cerevisiae* werden als Fusion mit der Sequenz der GAL4-Aktivationsdomäne (GAL4-AD) exprimiert. Die so synthetisierten Proteine werden als *Prey*-Proteine bezeichnet. Interagiert WHIRLY3 mit einem *Prey*-Protein so kommt es zur räumlichen Annäherung der beiden Domänen des GAL4-Transkriptionsfaktors und eine Reporterengenkassette wird transkribiert.

Alle Arbeiten zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen wurden mit dem *Matchmaker Library Construction & Screening* Kit der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

### 2.6.1 Hefestämme

Zur Erstellung der cDNA-Bank (2.6.6) und zur Überprüfung der Interaktion von möglichen Interaktionspartnern des WHIRLY3-Proteins in Hefen (2.6.3) wurde der Hefestamm AH109 verwendet. Dieser Stamm ist auxotroph für Adenin, Tryptophan, Leucin und Histidin.

Das *bait*-Plasmid (pGBKT7-WHIRLY3; 2.6.3) wurde in den Hefestamm Y187 transformiert, welcher mit dem Stamm AH109 gepaart werden kann. Dieser Stamm ist auxotroph für Adenin, Tryptophan, Leucin, Methionin und Histidin.

### 2.6.2 Anzucht von Hefen

Die Anzucht von Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) der Stämme AH109 und Y187 (2.6.1) erfolgte in Flüssigkultur üN bei 29 °C im Schüttelinkubator (Labshaker, InnovaTM4400) bei 250 rpm oder auf agarhaltigen Medien im Brutschrank (WTB Binder) für mindestens drei Tage. Untransformierte Hefen wurden dabei auf YPD(A)-Medium angezogen. Zur Selektion transformierter Hefen erfolgte die Anzucht auf SD-*Dropout*-Medium, dem eine oder mehrere Aminosäuren fehlten, für die die untransformierten Hefen auxotroph waren.

YPD(A):	20 g/l	Bacto Peptone
	10 g/l	Hefeextrakt
	(1,5% (v/v)	0,2% Adenin-Lösung)
		mit HCl pH 6,5 einstellen

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium 5 % (v/v) sterilfiltrierte 40%ige Glukoselösung zugesetzt.

SD- <i>Dropout</i> -	6,7 g/l	<i>yeast nitrogen base without amino acids</i>
Medium:	0,74 g/l	<i>Dropout-Supplement</i>
	5 g/l	Glukose
		mit KOH pH 5,8 einstellen

### 2.6.3 Klonierung von Konstrukten in die Vektoren pGBKT7 und pGAD424

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern des WHIRLY3-Proteins wurde eine cDNA-Bank in Hefe (2.6.6) mit Hilfe eines Fusionsproteins aus WHIRLY3 und der GAL4-DNA-Bindedomäne durchmustert (Abb. M3, M4). Zur Erstellung dieses sogenannten *Bait*-Proteins wurde der Vektor pGBKT7 verwendet, der die Sequenz für die GAL4-DNA-Bindedomäne beinhaltet (Abb. M5).

Die WHIRLY3-Sequenz umfasst einen Bereich, der für eine Importsequenz für die Plastiden kodiert. Es wurde ein Konstrukt ohne die für die Importsequenz kodierenden Nukleotide (Nukleotid 1 bis 213) erstellt. Ein weiterer Bereich des WHIRLY3-Gens, der die Interaktionsstudien stört, ist die Sequenz für eine putative Autoregulationsdomäne (Nukleotid 758 bis 807). Eine Autoregulationsdomäne führt zu einer Aktivierung der Reportergene ohne vorliegende Protein-Protein-Interaktion und daher wurde die entsprechende Sequenz entfernt (vergleiche Anhang Abb. A4). Zur Erstellung des Konstrukts wurden in einer PCR (2.4.9) die Oligonukleotide WHY3-*Bam*HI-fwd und WHY3-*Sall*-rvs (Tab. M6) verwendet.

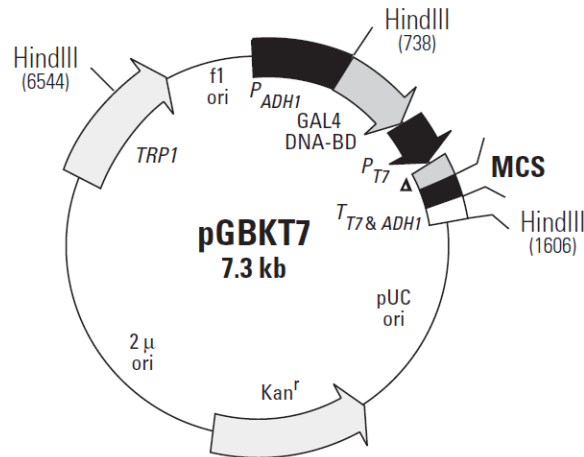


Abb. M5: Schematische Darstellung des Vektors pGBKT7. *Kan<sup>r</sup>*: Gen, das die Resistenz gegen Kanamycin vermittelt; pUC ori: Replikationsursprung für die Vermehrung in *E. coli*; *TRP1*: Gen für die Synthese von Tryptophan; *T<sub>T7&ADH1</sub>*: Terminator; GAL4-DNA-BD: Sequenz für die DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors; *P<sub>T7</sub>* und *P<sub>ADH1</sub>*: Promotoren; 2μ ori: Replikationsursprung für die Vermehrung in *S. cerevisiae*; MCS: *multiple cloning site*. Die Vektorkarte wurde aus dem Handbuch des *Matchmaker Library Construction & Screening Kits* der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) entnommen.

Während der Vervielfältigung des *WHIRLY3*-Konstruktes wurde mit Hilfe der Oligonukleotide am 5'Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bam*HI und am 3'Ende eine Restriktionsschnittstelle für *Sal*I angefügt. Mit Hilfe dieser Schnittstellen erfolgte die gerichtete Einfügung des Konstrukts in den pGBKT7-Vektor mit Hilfe des *Rapid DNA Ligation Kits* (Fermentas, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers. Der gesamte Ligationsansatz wurde für eine Hitzeschocktransformation von *E. coli* Zellen verwendet (2.4.3.4). Nach Anzucht der transformierten Zellen auf LB-Medium mit Kanamycin (2.4.3.2) wurde aus einzelnen Kolonien Plasmid-DNA präpariert (2.4.3.3), welche sequenziert wurde (2.4.6). Fehlerfrei transformierte Vektoren wurden für die Durchmusterung der cDNA-Bank (2.6.6) verwendet.

Für einige der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten möglichen Interaktionspartner des *WHIRLY3*-Proteins wurde ein Test der Protein-Protein-Interaktion in Hefen durchgeführt. Dafür wurden Hefen des Stammes AH109 mit dem pGBKT7 Vektor, der das *WHIRLY3*-Konstrukt trug, und dem Vektor pGAD424 (Abb. M6), in den die Sequenzen der möglichen Interaktionspartner eingefügt wurden, kotransformiert (2.6.4). Sequenzen, die im Vektor pGAD424 vorliegen werden als Fusionskonstrukt mit der GAL4-Aktivierungsdomäne exprimiert. Der Test auf Interaktion der möglichen Interaktionspartner mit dem *WHIRLY3*-Protein wurde mittels *SD-Dropout*-Medium (2.6.2) durchgeführt. Dafür wurden einzelne Kolonien auf Platten aufgetragen, die kein Tryptophan, kein Leucin sowie kein Histidin enthielten. Anschließend wurden die Platten für zwei bis drei Tage angezogen. Kommt es zum Wachstum der Hefen auf den Platten, interagieren die Proteine miteinander.

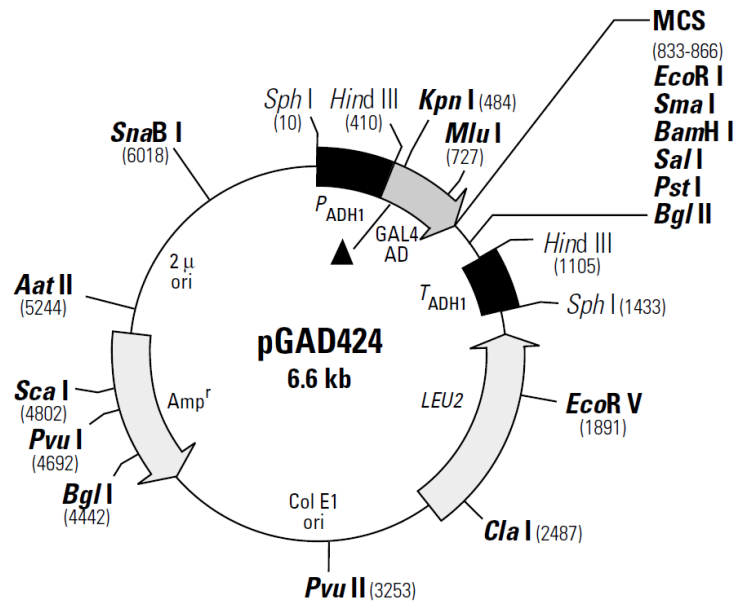


Abb. M6: Schematische Darstellung des Vektors pGAD424. *Amp<sup>r</sup>*: Gen, das die Resistenz gegen Ampicillin vermittelt; Col E1 ori: Replikationsursprung für die Vermehrung in *E. coli*; *Leu2*: Gen für die Synthese von Leucin; *T<sub>ADH1</sub>*: Terminator; *GAL4 AD*: Sequenz für die Autoaktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors; *P<sub>ADH1</sub>*: Promotor; 2μ ori: Replikationsursprung für die Vermehrung in *S. cerevisiae*; MCS: *multiple cloning site*. Die Vektorkarte wurde aus dem Handbuch des *Matchmaker Library Construction & Screening Kits* der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) entnommen.

Für die Überführung in den Vektor pGAD424 wurden die vollständigen kodierenden Sequenzen der möglichen Interaktionspartner COR15 (can8), CDKG1 (can9), PSBR (can11), Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase (can12), zweier unbekannter Proteine (can14, can15) und GRP7/CCR2 (can16) mit Hilfe von Oligonukleotiden (Tab. M6) so amplifiziert (2.4.9), dass sie Schnittstellen für Restriktionsenzyme am 5' und 3' Ende trugen. Dies ermöglichte eine gerichtete Einbringung in die MCS des Vektors pGAD424, die wie für den Vektor pGBKT7 bereits beschrieben durchgeführt wurde.

Tab. M6: Oligonukleotide für die Erstellung der DNA-Sequenzen für das Hefe-2-Hybridsystem. Die Sequenzen sind jeweils in 5' - 3' Richtung angegeben.

Name	Sequenz
WHY3- <i>Bam</i> HI-fwd	CGGGATCCCGCAAAACGCTGAAGTATCTTC
WHY3- <i>Sall</i> -rvs	ACGCGTCGACGTCGGCCATAGCGGCCGCGGAATCATCTACTCCATTC GTAGT
can8- <i>Bam</i> HI-fwd	CGGGATCCCGATGGCGATGTCTTTCTCAGG
can8- <i>Pst</i> I-rvs	CCAATGCATTGGTTCTGCAGTTCTACTTTGTGGCATCCTTAG
can9- <i>Bam</i> HI-fwd	CGGGATCCCGATGGCAGCAGGGGGTGT
can9- <i>Pst</i> I-rvs	CCAATGCATTGGTTCTGCAGTTTTACCGCTTTGGAGGATATGT
can11- <i>Bam</i> HI-fwd	CGGGATCCCGATGGCTGCTTCAGTGATGCT
can11- <i>Pst</i> I-rvs	CCAATGCATTGGTTCTGCAGTTTTACTGAGCCAAAGCACTTGT
can12- <i>Eco</i> RI-fwd	GGAATTCGGATGCCTCAGGCACCGATG
can12- <i>Sma</i> I-rvs	TTAGAGTTTGACAACTTCGGG
can14- <i>Bam</i> HI-fwd	CGGGATCCCGATGGAGGAAGGTCTAAAGATT
can14- <i>Pst</i> I-rvs	CCAATGCATTGGTTCTGCAGTTTTAAACAGCTGCTTCAGCTCT
can15- <i>Bam</i> HI-fwd	CGGGATCCCGATGGCTTTTAGACGACCACT
can15- <i>Pst</i> I-rvs	CCAATGCATTGGTTCTGCAGTTTACAAAGCAGCCTTTTCTTTG
can16- <i>Bam</i> HI-fwd	CGGGATCCCGATGGCGTCCGGTGATGTTG
can16- <i>Pst</i> I-rvs	CCAATGCATTGGTTCTGCAGTTTTACCATCCTCCACCACCA

### 2.6.4 Transformation von Hefen

Für die Transformation von Hefen wurden zunächst kompetente Hefezellen hergestellt. Hierfür wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zwei bis drei frische Hefekolonien in 1 ml YPD-Medium (2.6.2) für 5 min mit Hilfe eines Vortexgerätes (MS2 Minishaker, IKA®, Staufen) vollständig gelöst. Die Hefelösung wurde mit 50 ml YPD-Medium in einem 250 ml Kolben vermischt. Die Anzucht der Hefen erfolgte üN (2.6.2). Am nächsten Morgen wurde die Hefekultur mit 300 ml YPD-Medium in einem 500 ml Kolben vermischt. Die OD<sub>600</sub> der Kultur sollte zwischen 0,2 und 0,3 liegen. Dann erfolgte eine Anzucht der Kultur für weitere 3 Std. bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6. Die Kultur wurde in 50 ml Reaktionsgefäße umgefüllt und bei RT für 5 min bei 1000 x g (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets in je 5 ml 1 x TE-Puffer durch vorsichtiges Schwenken aufgenommen. Die Lösungen wurden vereinigt und nochmals bei 1000 x g bei RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1,5 ml 1xTE/1x LiAc resuspendiert. Die frisch hergestellten Hefezellen konnten nun direkt für die Transformation eingesetzt werden.

Als Vorbereitung für die Transformation von Hefezellen erfolgte eine Denaturierung von DNA aus Heringssperma (10 mg/ml), indem diese zweimal für 20 min auf 95 °C erhitzt und im Anschluss auf Eis abgekühlt wurde. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden für die Transformation 0,1 µg Plasmid mit 10 µl denaturierter Heringssperma-DNA und 100 µl frisch hergestellten kompetenten Hefezellen gemischt. Anschließend wurde die Lösung mit 600 µl frisch angesetzter PEG/LiAc-Lösung (*Matchmaker*



*Library Construction & Screening Kit*, Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) ergänzt und mit dem Vortexgerät für 10 sek gemischt. Die Lösung wurde für 30 min bei 30 °C und 300 rpm im Heizblock inkubiert. Durch die anschließende Zugabe von 70 µl DMSO wurden die Zellwände der Hefen für die Vektoren durchlässiger. Es folgte eine Inkubation bei 42 °C für 15 min und anschließend eine Inkubation auf Eis für 2 min. Durch eine kurze Zentrifugation wurden die Zellen sedimentiert. Das Pellet wurde in 500 µl sterilem 1 x TE gelöst und auf dem entsprechenden *SD-Dropout-Medium* (2.6.2) angezogen.

### 2.6.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen wurde eine Hefekolonie in 1,5 ml des entsprechenden *SD-Dropout-Mediums* angezogen (2.6.2). Die Kultur wurde für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge (Model 5415 D, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) pelletiert, der Überstand wurde dekantiert und das Pellet im restlichen Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte der Zellaufbruch durch Zugabe von 10 µl Lyticase-Lösung (Sigma, Steinheim; 5 U/µl in TE-Puffer), welche mit Hilfe eines Vortexgerätes (MS2 Minishaker, IKA Labortechnik, Staufen) gründlich mit der Lösung vermischt wurde. Nach einer 30- bis 60-minütigen Inkubation bei 37 °C und 250 rpm im Heizblock (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg) wurde die Lösung mit 10 ml 20 % SDS versetzt, für 1 min mit Hilfe eines Vortexgerätes gründlich gemischt und anschließend bei -20 °C eingefroren. Der wieder aufgetauten Probe wurden 180 µl TE-Puffer zugegeben. Nach gründlichem Mischen der Lösung wurden je 100 µl Phenol und Chloroform:Isoamylalkohol (24:1, v:v) hinzugefügt und wiederum für 1 min mit Hilfe eines Vortexgerätes gründlich vermischt. Durch eine 10-minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit bildeten sich zwei Phasen. Die obere, wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und vorsichtig mit 700 µl EtOH vermischt. Anschließend erfolgte die Fällung der Plasmid-DNA für 5 min bei RT. Die gefällte Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert und das Pellet wurde mit 500 µl EtOH gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wurde die DNA in 20 µl Wasser resuspendiert.

Zur Identifizierung der Nukleotidsequenzen in den isolierten Plasmiden erfolgte eine PCR (2.4.9), in der Oligonukleotide, die im 5' und 3' Bereich der MCS der Plasmide binden, Verwendung fanden. Die DNA-Fragmente wurden sequenziert (2.4.6) und die Sequenzen wurden mit Sequenzdatenbanken (2.7) verglichen.

### 2.6.6 Erstellung und Durchmusterung einer cDNA-Bank

Die Erstellung und Durchmusterung einer cDNA-Bank in Hefe erfolgte mit dem *Matchmaker Library Construction & Screening Kit* der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) nach Angaben des Herstellers. Als Ausgangsmaterial für die Synthese der cDNA wurde RNA (2.4.12.1) aus drei, vier, fünf, sechs und sie-

ben Wochen alten Pflanzen des Wildtyps von *A. thaliana* verwendet. Die Erstellung der cDNA-Bank ist in Abb. M7 schematisch gezeigt. Aus den Hefekolonien, die nach Durchmusterung der cDNA-Bank auf Minimalmedium wachsen konnten, wurde zur Identifizierung der möglichen Interaktionspartner des WHIRLY3-Proteins Plasmid-DNA isoliert (2.6.5).

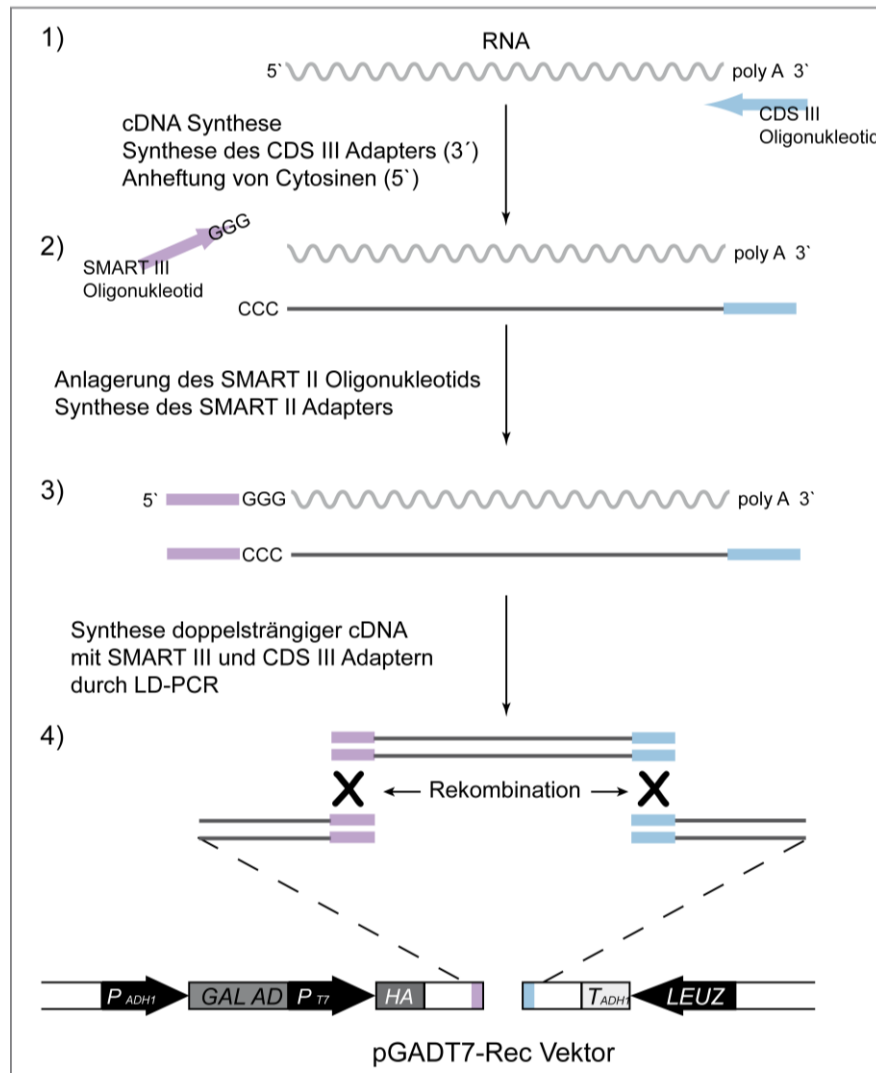


Abb. M7: Erstellung einer cDNA-Bank für das Hefe-2-Hybridsystem. 1) RNA wurde zunächst in cDNA umgeschrieben. Durch die dabei verwendeten CDS III Oligonukleotide, die an den Poly-A Schwanz der RNA binden, entstanden CDS III Adapter am 3' Ende. Durch eine spezielle reverse Transkriptase wurden am 5' Ende vermehrt Cytosine an die cDNA angelagert. 2) An diesen CCC-Überhang banden SMART II Oligonukleotide. Die reverse Transkriptase wechselte die Matrize von der RNA zum SMART II Oligonukleotid und fügte am 3' Ende der cDNA die SMART II Adaptersequenz an. Die cDNA enthielt spezifische Adapter am 3' und 5' Ende. 3) Mittels *long-distance* PCR (LD-PCR) wurde doppelsträngige cDNA synthetisiert, 4) welche über Rekombination zielgerichtet in den pGADT7-Rec Vektor inseriert wurde. Über diesen Vektor konnte die cDNA in Fusion mit der Sequenz für die GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL AD) exprimiert werden.  $P_{ADH1}$ : hefespezifischer Promotor,  $P_{T7}$ : bakterienspezifischer Promotor, HA: Sequenz für das Hämagglutinin-Tag,  $T_{ADH1}$ : hefespezifischer Terminator, LEUZ: Reportergen, ermöglicht Wachstum auf Medium ohne Leucin

---

### 2.6.7 X-Gal-Assay

Der X-Gal-Assay wird im Rahmen des Hefe-2-Hybridsystems eingesetzt, um mögliche Protein-Protein-Interaktionen zu testen. Er wurde modifiziert nach Duttweiler (1996) durchgeführt.

Die kotransformierten Hefen wurden auf agarhaltigem Medium angezogen (2.6.2) und mit Chloroform bedeckt. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde das Chloroform entfernt und die Hefen für 10 min getrocknet. Anschließend erfolgte eine Überschichtung der Hefen mit einer Agarose-X-Gal-Lösung. Zur Herstellung der Agarose-X-Gal-Lösung wurden 0,1 g Agarose in 10 ml 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7) aufgekocht, kurz abgekühlt und mit 2,5 mg X-Gal (0,25 mg/ml; Roth, Karlsruhe) vermischt. Die überschichteten Hefen wurden weiter kultiviert, bis eine Blaufärbung zu sehen war.

## 2.7 Datenbanken und Internetseiten

Die folgenden Datenbanken und Internetseiten wurden verwendet:

- *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR); <http://www.arabidopsis.org/>
- SIGnAL, *Salk Institute Genomic Analyzes Laboratory*; <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>
- *The European Arabidopsis Stock Centre* (uNASc); <http://arabidopsis.info/>
- *The Sequence Manipulation Suite*; <http://www.bioinformatics.org/sms/>
- ExPASy: *Bioinformatics Resource Portal*; <http://www.expasy.org/>
- *National Center for Biotechnology Information* (NCBI); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- *Primer3*; <http://frodo.wi.mit.edu/>
- Quant Prime: qPCR primer design tool; <http://www.quantprime.de/>
- ClustalW2; <http://www.ebi.ac.uk/services>
- PSORT; <http://www.psort.org/>
- TargetP; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>
- iPSORT; [iprort.hgc.jp/predict.cgi](http://iprort.hgc.jp/predict.cgi)
- ChloroP1.1; [cbs.dtu.dk/services/ChloroP](http://cbs.dtu.dk/services/ChloroP)

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Subzelluläre Lokalisation der WHIRLY-Proteine von *Arabidopsis thaliana*

#### 3.1.1 Subzelluläre Lokalisierung von WHIRLY1

Für das HvWHIRLY1-Protein der Gerste wurde immunologisch eine duale Verteilung auf den Zellkern und die Chloroplasten gezeigt. HvWHIRLY1 besitzt in beiden Kompartimenten die gleiche molekulare Größe (Grabowski et al., 2008). Um zu prüfen, ob auch das WHIRLY1-Protein von *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*, L.) dasselbe Verteilungsmuster in der Zelle zeigt wie HvWHIRLY1, wurden immunologische Studien durchgeführt. Da kein Antikörper gegen das native WHIRLY1-Protein von *A. thaliana* vorhanden war, kam eine transgene Linie (pnWHIRLY1:HA) zum Einsatz, die die Sequenz für *WHIRLY1* in Fusion mit der Sequenz für das HA-Tag (Hämagglutinin-Tag) unter Kontrolle des 35S-Promotors im genetischen Hintergrund der *why1-1*-Mutante überexprimiert (2.2.1; Grabe, 2007; Isemer et al., 2012b).

Die subzelluläre Verteilung des rekombinanten WHIRLY1:HA-Proteins in der Linie pnWHIRLY1:HA wurde immunologisch getestet. Hierfür wurden zunächst Chloroplasten (2.5.2.1) und Zellkerne (2.5.4) aus der transgenen Linie sowie dem Wildtyp isoliert und Proteinextrakte aus diesen Zellfraktionen mittels SDS-PAGE entsprechend ihrer Größe aufgetrennt (2.5.7). Nach Immobilisierung der Proteine auf einer Membran (2.5.9.1) erfolgte die Immundetektion des rekombinanten WHIRLY1:HA-Proteins mittels eines gegen das HA-Tag gerichteten Antikörpers (2.5.9.3). Das HA-Tag war in der transgenen Linie in Zellkernen und Chloroplasten detektierbar (Abb. E1). Wie das native HvWHIRLY1-Protein der Gerste (Grabowski et al., 2008) hatte das rekombinante WHIRLY1:HA-Protein in beiden Kompartimenten die gleiche molekulare Größe (Abb. E1). Beide Isoformen waren etwa 24 kDa groß, was der theoretischen Größe des prozessierten WHIRLY1-Proteins in Plastiden entspricht. In Zellfraktionen des Wildtyps war das HA-Tag nicht nachweisbar (Abb. E1). Um die Reinheit der Fraktionen zu zeigen, wurden in gleicher Weise angefertigte Membranen mit Antikörpern gegen Cytochrom  $b_{559}$ , als spezifisches Markerprotein für Chloroplasten und gegen die RNA Polymerase I, als spezifisches Markerprotein für Zellkerne immunodekoriert. Diese Analysen zeigten, dass die Chloroplastenfraktion keine detektierbaren Mengen an Kernproteinen enthielt und umgekehrt die Zellkernfraktion keine detektierbaren Mengen an Plastidenproteinen (Abb. E1).

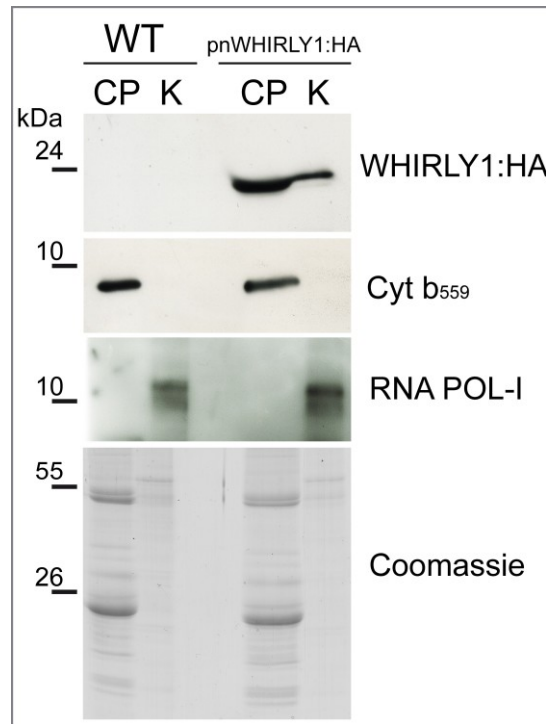


Abb. E1: Immunologischer Nachweis eines rekombinanten WHIRLY1:HA-Proteins in Zellkern- und Chloroplastenfractionen aus Blättern einer transgenen Linie von *A. thaliana*, die die komplette WHIRLY1-Sequenz in Fusion mit einem HA-Tag (pnWHIRLY1:HA) überexprimiert, und des Wildtyps (WT). Proteinextrakte aus Chloroplasten- (CP) und Zellkern-fractionen (K) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf einer Membran immobilisiert. Es wurden Antikörper gegen das HA-Tag des rekombinanten WHIRLY1-Proteins sowie gegen Cytochrom b<sub>559</sub> (Cyt b<sub>559</sub>) und die RNA Polymerase I (RNA POL-I) verwendet. Als Beladungskontrolle wurde ein vergleichbares Gel mit Coomassie-Brillantblau gefärbt.

#### 3.1.2 Ermittlung der Längen von WHIRLY-Transkripten mittels RLM-RACE

Das dual lokalisierte Protein WHIRLY1 hat im Zellkern die gleiche molekulare Größe wie die prozessierte Isoform in Plastiden (3.1.1). Während Proteine in den Plastiden prozessiert werden, ist dies für Proteine im Zellkern nicht möglich. Wie die beiden gleich großen WHIRLY1-Isoformen dennoch entstehen, ist unbekannt. Eine Möglichkeit wäre, dass in der Zelle zwei unterschiedlich lange WHIRLY1-Transkripte vorliegen, von denen eines die Sequenz für die plastidäre Importsequenz beinhaltet und für die in den Plastiden lokalisierte Isoform des WHIRLY1-Proteins kodiert und ein anderes kürzeres Transkript für das kleinere kernlokalisierte Protein kodiert (Small et al., 1998). Durch Prozessierung von WHIRLY1 beim Import in die Plastiden würden so zwei gleich große Isoformen entstehen.

Um die Längen der Transkripte für alle drei WHIRLY-Proteine von *A. thaliana* zu ermitteln, wurde die 5'RLM-RACE-Methode (RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends) verwendet (2.4.13). Mit dieser Methode können Transkripte unterschieden werden, die von demselben Gen kodiert werden, jedoch unterschiedlich lang sind. Möglicherweise bilden sich die unterschiedlich langen Transkripte nur wäh-

rend einer bestimmten Entwicklungsphase der Pflanze. Daher wurde die für den 5'RLM-RACE-Ansatz benötigte cDNA aus einer RNA-Mischprobe synthetisiert, die aus Blättern unterschiedlicher Entwicklungsstadien des Wildtyps von *A. thaliana* isoliert wurde.

Nach der PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für die Gene *WHIRLY1*, *WHIRLY2* bzw. *WHIRLY3* waren für jedes der drei Gene Banden zu erkennen, deren Größe mit der des vollständigen Transkriptes übereinstimmt (Abb. E2A). Eine Sequenzierung dieser DNA-Fragmente zeigte, dass es sich hier um die *WHIRLY*-Transkripte für die jeweiligen Vorstufenproteine handelt.

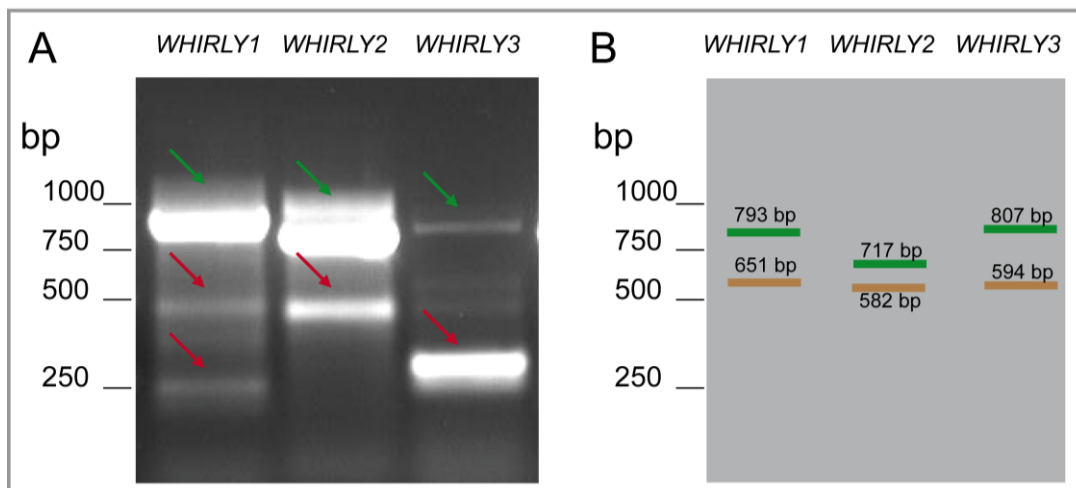


Abb. E2: Länge der *WHIRLY*-Transkripte in Blättern des Wildtyps von *A. thaliana*. **A** 5'RLM-RACE-Analyse mit spezifischen Oligonukleotiden für die drei *WHIRLY*-Gene. Die mit Pfeilen markierten DNA-Fragmente wurden sequenziert. Grüne Pfeile geben *WHIRLY*-Transkripte an, rote Pfeile zeigen unspezifische Transkripte an. **B** Schematische Darstellung der Längen von *WHIRLY*-Transkripten. Die grünen Striche repräsentieren die Transkripte für die Vorstufenproteine, die braunen Striche zeigen die theoretischen Größen, die die Transkripte ohne die Importsequenzen hätten.

Zusätzlich wurden für *WHIRLY2* und *WHIRLY3* jeweils ein und für *WHIRLY1* zwei kleinere DNA-Fragmente detektiert (Abb. E2A). Die Sequenzierung dieser DNA-Fragmente ergab, dass es sich hier nicht um kürzere Transkripte der *WHIRLY*-Gene sondern um unspezifische DNA-Fragmente handelt. Sehr schwache Banden, wie sie zum Beispiel für *WHIRLY3* detektierbar waren, wurden nicht untersucht. Zum Vergleich sind in Abbildung E2B die theoretischen Längen der *WHIRLY*-Transkripte dargestellt, die letztere mit und ohne die Importsequenzen hätten (Vorhersage mit dem Programm ChloroP1.1). Die Befunde zeigen, dass in Blättern verschiedener Entwicklungsstadien nur ein spezifisches Transkript für jedes *WHIRLY*-Gen gebildet wird. Die gleichen Molekulargrößen der beiden *WHIRLY1*-Isoformen in Plastiden und dem Zellkern können somit nicht auf zwei unterschiedlich lange Transkripte zurückgeführt werden.

#### 3.1.3 Untersuchungen zum Mechanismus der Umverteilung von WHIRLY1 an Plastomtransformanten

Das dual lokalisierte WHIRLY1-Protein von *A. thaliana* hat wie das verwandte Protein der Gerste in Zellkernen und Plastiden die gleiche molekulare Größe, und beide Isoformen entstehen aus nur einem Transkript (3.1.1, 3.1.2). Da WHIRLY1 im Zellkern ähnlich groß ist wie das prozessierte WHIRLY1-Protein in den Plastiden, wird die Hypothese aufgestellt, dass die beiden Isoformen durch eine Umverteilung des prozessierten WHIRLY1-Proteins aus dem Organell zum Zellkern entstehen.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden immunologische Untersuchungen an Plastomtransformanten des Tabaks (*Nicotiana tabacum*) durchgeführt. Eine Genkassette, die die WHIRLY1-Sequenz aus *A. thaliana* ohne die plastidäre Importsequenz in Fusion mit der Sequenz für das HA-Tag beinhaltet (Abb. E3A), wurde in das Plastom des Tabaks inseriert (Isemer et al., 2012a). Um die Selektion von Plastomtransformanten zu ermöglichen, beinhaltet die Genkassette das *aadA*-Gen, welches den transformierten Pflanzen eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Spectinomycin verleiht (Abb. E3A). Es wurden fünf unabhängige Linien identifiziert und für die Untersuchungen verwendet.

Um zu prüfen, ob diese fünf Linien die WHIRLY1-Genkassette enthalten, wurde die Southern Blot Methode verwendet. Genomische DNA (2.4.5) aus den Linien wurde mit *EcoRI* geschnitten, auf einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und auf einer Membran immobilisiert (2.4.11.1). Anschließend erfolgte eine Detektion mit Hilfe einer radioaktiv markierten Sonde, die an das *rps12*-Gen bindet (2.4.11.3). Ein 1038 bp langes Fragment wies auf eine erfolgreiche Integration der Genkassette hin, wohingegen ein 3136 bp langes Fragment aus der untransformierten pDNA des Wildtyps stammte. Somit schienen die Linien 1, 2 und 3 homoplastomisch zu sein, wohingegen die Linie 5 heteroplastomisch war (Abb. E3B). In der Linie 4 ist es zu einer teilweisen Deletion der Genkassette gekommen, wodurch die Erkennungssequenz für das Enzym *EcoRI* verloren gegangen ist. In dieser Linie wurde ein fast 5 kbp großes Fragment detektiert (Abb. E3B). Entsprechend der mit dem Southern Blot Verfahren erzielten Ergebnisse war mit Hilfe eines HA-Tag-Antikörpers das rekombinante WHIRLY1-Protein nur in Proteinextrakten der Linien 1, 2, 3 und 5 detektierbar. Im Wildtyp und in der Linie 4 konnte das Protein nicht nachgewiesen werden (Abb. E3C). Ein Proteinextrakt aus Zellen von *E. coli*, die die Genkassette exprimierten, diente als Kontrolle.

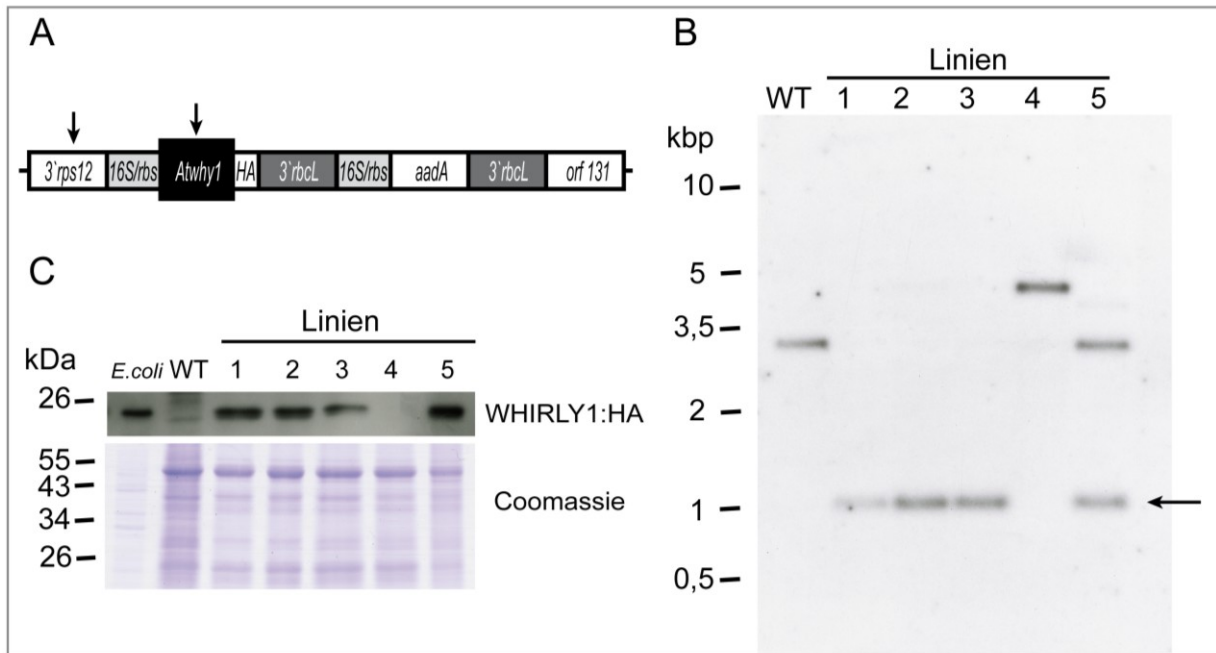


Abb. E3: Molekulare Charakterisierung von WHIRLY1:HA Plastomtransformaten des Tabaks. **A** Schematische Darstellung der Genkassette, die für die Transformation der pDNA des Tabaks verwendet wurde. *Atwhy1*: WHIRLY1-cDNA-Sequenz von *A. thaliana* ohne die Sequenz für die plastidäre Importsequenz; *3' rbcL*: Terminatorsequenz; *aadA*: Gen für die Streptomycin 3'-Adenylyltransferase, *3' rps12*, *ori 131*: flankierende Sequenzen der pDNA; 16S/rbs: Promotor und Ribosomenbindestelle. *EcoRI*-Restriktionsstellen sind mit Pfeilen markiert. **B** Southern Blot Analyse in fünf unabhängigen Plastomtransformatenlinien (1-5) und im Wildtyp des Tabaks (WT). Die genomische DNA wurde mit *EcoRI* hydrolysiert. Die Detektion erfolgte mittels einer Sonde, die spezifisch für den 3'-Bereich des *rps12*-Gens ist. Die erfolgreiche Insertion ist an einem 1038 bp Fragment (markiert mit einem Pfeil) erkennbar. **C** Immunologischer Nachweis des rekombinanten WHIRLY1:HA-Proteins in Proteinextrakten aus Blättern der fünf Plastomtransformatenlinien. Als Kontrollen wurden Proteinextrakte aus dem Wildtyp des Tabaks und *E. coli* Zellen, die die für die Transformation verwendete Genkassette exprimierten, genutzt. Als Beladungskontrolle wurde ein vergleichbares Gel mit Coomassie-Brillantblau gefärbt.

Nur die Linie 5 produzierte Samen und wurde daher für weitere Analysen verwendet. Da es sich um eine heteroplastomische Linie handelt, wurde zunächst geprüft, wie viele Kopien der pDNA die Genkassette besitzen. Dazu wurde die DNA (2.4.5) dieser Linie mittels quantitativer *Real-Time* PCR (2.4.10) untersucht. Das Plastidengen *psbD* und das Gen für die 23S rRNA der Plastiden waren in der DNA etwa zweimal bzw. dreimal so häufig nachweisbar wie das rekombinante WHIRLY1-Gen (Abb. E4). Das Gen für die 23S rRNA kommt in zwei Kopien in der pDNA vor, während das Gen *psbD* nur einmal vorkommt. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass in der Linie 5 mehr als 50% der Kopien der pDNA die Genkassette enthielten. Weiterhin wurde das rekombinante WHIRLY1-Gen mehr als 100mal häufiger nachgewiesen als die Kerngene *ACTIN* und *EF1a* (Abb. E4).



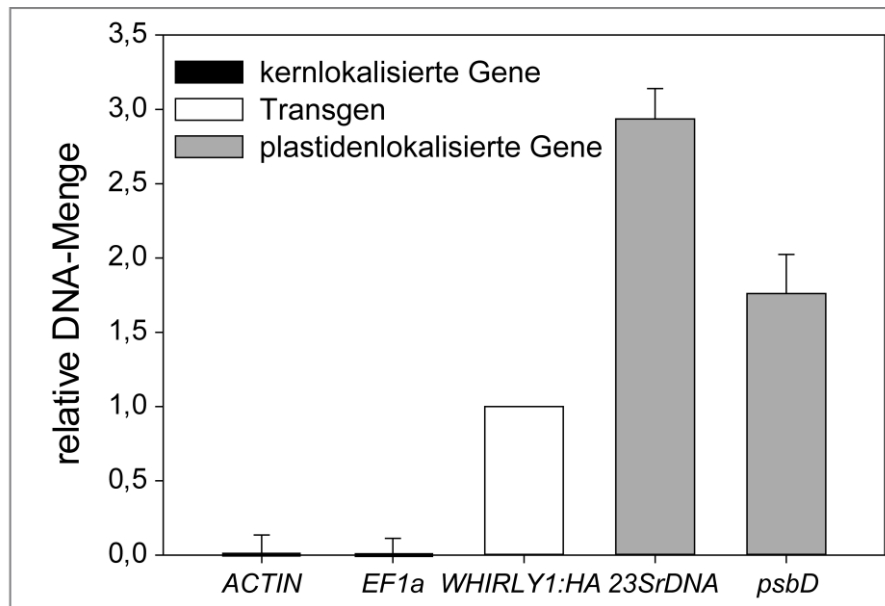


Abb. E4: Bestimmung der Kopienzahl von pDNA, die die *WHIRLY1*-Genkassette besitzen. Es wurde die DNA-Menge des Plastidengens für die 23S rRNA und des Plastidengens *psbD* sowie die der Kerngene *ACTIN* und *EF1a* in Blättern der Plastomtransformantenlinie 5 mittels quantitativer *Real-Time* PCR untersucht und mit der des Transgens *WHIRLY1:HA* verglichen. Als Kontrollgen wurde die 18SrDNA genutzt. Die DNA-Menge des Transgens *WHIRLY1:HA* ist auf den Wert 1 normiert, auf den sich alle weiteren Werte beziehen. Standardabweichungen wurden aus drei technischen Replikaten berechnet.

Um einen möglichen Transfer des rekombinanten *WHIRLY1*-Proteins aus den Plastiden in den Zellkern zu untersuchen, wurden aus Blättern der Linie 5 Chloroplasten und Zellkerne isoliert (2.5.2.2, 2.5.5). Zusammen mit einem Gesamtproteinextrakt wurden Proteine aus den Zellfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.5.7), auf einer Membran immobilisiert (2.5.9.1) und anschließend mit einem Antikörper gegen das HA-Tag immundekoriert (2.5.9.3). Es zeigte sich sowohl im Gesamtproteinextrakt und den Chloroplasten als auch in der Zellkernfraktion ein Signal mit der Größe des rekombinanten *WHIRLY1:HA*-Proteins (Abb. E5). Das *WHIRLY1:HA*-Protein, welches in den Chloroplasten gebildet wird, ist somit auch im Zellkern nachweisbar. Dies spricht für eine Umverteilung von *WHIRLY1* aus dem Organell in den Zellkern. Als Kontrolle für die Größe des rekombinanten *WHIRLY1:HA*-Proteins aus der Plastomtransformante wurde ein Proteinextrakt aus Blättern einer transgenen Linie von *A. thaliana* verwendet, welche *WHIRLY1* ohne die Importsequenz in Fusion mit einem HA-Tag synthetisiert (n*WHIRLY1:HA*, 2.2.1). Als zusätzliche Kontrolle diente ein Proteinextrakt aus Zellen von *E. coli*, die die Genkassette exprimieren, welche für die Erstellung der Plastomtransformanten genutzt wurde (Abb. E5). Um die Reinheit der Fraktionen zu zeigen, wurden entsprechend angefertigte Membranen mit Antikörpern gegen die Proteine Cytochrom *b*<sub>559</sub> als spezifisches Markerprotein für Chloroplasten und Histon H<sub>2</sub>B als spezifisches Markerprotein für Zellkerne immundekoriert. Diese Analysen zeigten, dass die Chloroplastenfraktion keine detektierbaren Mengen an Kernproteinen enthielt und umgekehrt die Zellkernfraktion keine detektierbaren Mengen an Plastidenproteinen (Abb. E5).

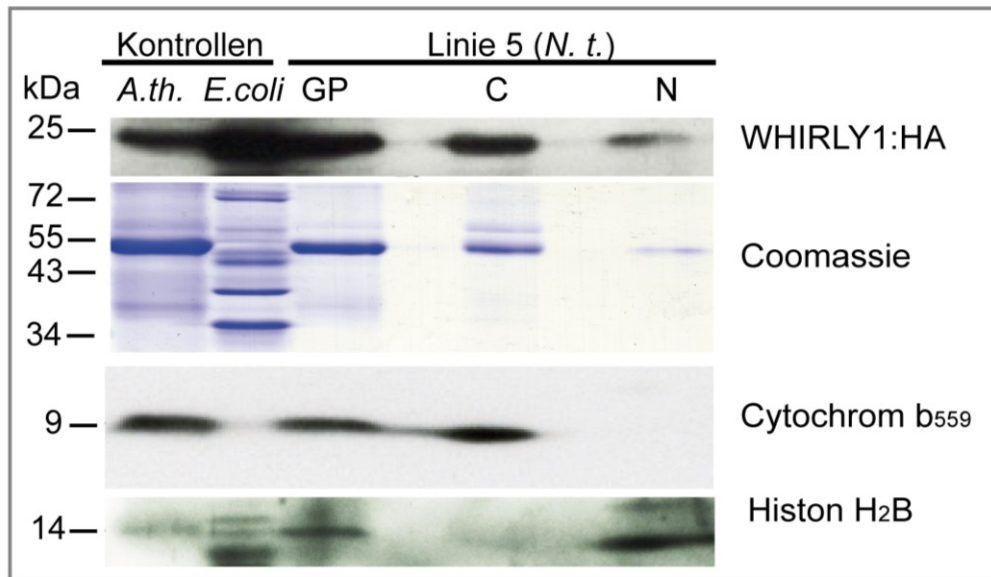


Abb. E5: Immunologischer Nachweis des rekombinanten WHIRLY1:HA-Proteins in Chloroplasten (C) und Zellkernen (N) sowie in einer Gesamtproteinprobe (GP) aus Blättern der Plastomtransformatenlinie 5. Es wurden Antikörper gegen das HA-Tag sowie gegen Cytochrom  $b_{559}$  und Histon  $H_{2B}$  verwendet. Zur Kontrolle erfolgte der Nachweis von WHIRLY1:HA in einem Proteinextrakt aus Blättern einer transgenen Linie von *A. thaliana*, die die prozessierte Form von WHIRLY1 in Fusion mit einem HA-Tag synthetisiert (*A.th.*), sowie in einem Proteinextrakt aus Zellen von *E. coli*, die diejenige Genkassette exprimieren, welche für die Erstellung der Plastomtransformaten genutzt wurde (*E. coli*). Als Beladungskontrolle wurde ein vergleichbares Gel mit Coomassie-Brillantblau gefärbt.

In früheren Arbeiten konnten bereits Zielgene der Kernform des Transkriptionsfaktors WHIRLY1 identifiziert werden (1.4.3.1). In Kartoffeln und in *A. thaliana* stehen *PR*-Gene unter transkriptioneller Kontrolle durch WHIRLY1 (Desveaux et al., 2000, 2005). In *A. thaliana* wurde das *KP1*-Gen, welches für ein Kinesinprotein kodiert, als Zielgen von WHIRLY1 identifiziert (Xiong et al., 2009). In der Plastomtransformatenlinie 5 wurde untersucht, ob das aus den Plastiden in den Zellkern umverteilte WHIRLY1:HA einen Einfluss auf die Transkriptmenge der entsprechenden Gene des Tabaks hat. Als mögliche Zielgene wurden die *PR*-Gene *PR10a*, *PR1*, *PR2* sowie die zum *KP1*-Gen von *A. thaliana* nahe verwandten Kinesingene *KCH1* und *TCK1* des Tabaks ausgewählt. Das Gen *EF1a* ist kein Zielgen von WHIRLY1, und die *EF1a*-Transkriptmenge wurde daher zur Kontrolle untersucht. Es wurde eine quantitative *Real-Time* PCR mit RNA aus Blättern des Wildtyps und der Linie 5 durchgeführt (2.4.10).

Die relativen Transkriptmengen der Gene *PR10a* (1,2), *KCH1* (1,4), *TCK1* (1,9) und *EF1a* (1,4) waren in der Plastomtransformatenlinie 5 im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert. Die Transkriptmenge des Gens *PR2* hingegen war um das 76-fache und die Transkriptmenge von *PR1* sogar um das 719-fache erhöht (Abb. E6). Das in den Plastiden synthetisierte WHIRLY1:HA-Protein verstärkt somit, wahrscheinlich nach dem Transfer in den Zellkern, spezifisch die Expression von *PR1* und *PR2*.

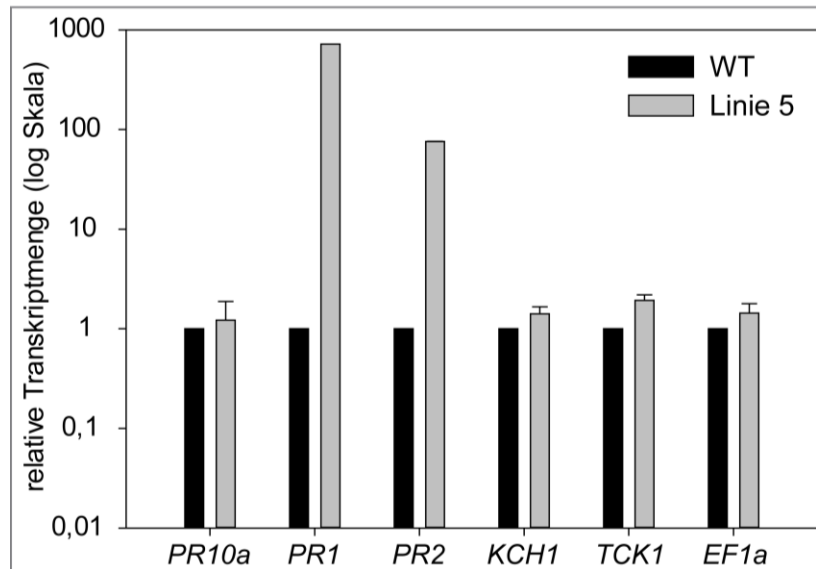


Abb. E6: Analyse der Transkriptmengen der Gene *PR10a*, *PR1*, *PR2*, *KCH1*, *TCK1* und *EF1a* in Blättern der Plastomtransformantenlinie 5 mittels quantitativer *Real-Time* PCR. Es wurde der Wildtyp (WT) mit der Linie 5 verglichen. Als Kontrollgen wurde *ACTIN* genutzt. Die Transkriptmengen im Wildtyp sind auf den Wert 1 normiert, auf den sich die weiteren Werte beziehen. Standardabweichungen wurden aus drei technischen Replikaten berechnet und waren kleiner als  $\pm 0,5$ .

#### 3.1.4 Subzelluläre Lokalisierung von WHIRLY-Fusionsproteinen

Bisherige Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der WHIRLY-Proteine von *A. thaliana* wurden mittels transienter Transformation von GFP-Fusionsproteinen durchgeführt und ergaben eine Lokalisation in den Organellen (Krause et al., 2005). Eine Lokalisation im Zellkern, wie sie in dieser Arbeit für WHIRLY1 mittels immunologischer Analysen gezeigt wurde (3.1.1), konnte für die GFP-Fusionsproteine jedoch nicht beobachtet werden. WHIRLY1 besitzt kein Kernlokalisierungssignal in seiner Sequenz und gelangt daher wahrscheinlich passiv über die Kernporen in den Zellkern. Bisher wurde angenommen, dass das WHIRLY1:GFP-Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von über 50 kDa zu groß ist, um die Kernporen passieren zu können (Krause et al., 2005).

Um die Ergebnisse der transienten Transformationsansätze zu prüfen, wurden stabil transformierte Pflanzen erstellt, die WHIRLY1 in Fusion mit GFP (*green fluorescent protein*) bzw. RFP (*red fluorescent protein*) synthetisieren. Für einen Vergleich der subzellulären Lokalisation der beiden plastidären WHIRLY-Proteine wurden zusätzlich stabile Transformanten hergestellt, die WHIRLY3 in Fusion mit RFP synthetisieren. Die Vektoren für die stabile Transformation wurden mit dem Gateway® System erstellt (2.4.3.5). In die Vektoren pB7FWG2.0 und pB7RWG2.0, welche die Sequenz für GFP bzw. RFP tragen, wurden die WHIRLY1- bzw. die WHIRLY3-Sequenz so eingefügt, dass sie als Fusionsproteine mit GFP bzw. RFP synthetisiert werden. Der Wildtyp von *A. thaliana* wurde jeweils mit dem Vektor pB7FWG2.0:WHIRLY1,

pB7RWG2:WHIRLY1 bzw. pB7RWG2:WHIRLY3 stabil transformiert (2.4.4). Für jeden Transformationsansatz wurden zwei unabhängige Linien untersucht, in denen das jeweilige Fluoreszenzsignal gut sichtbar war.

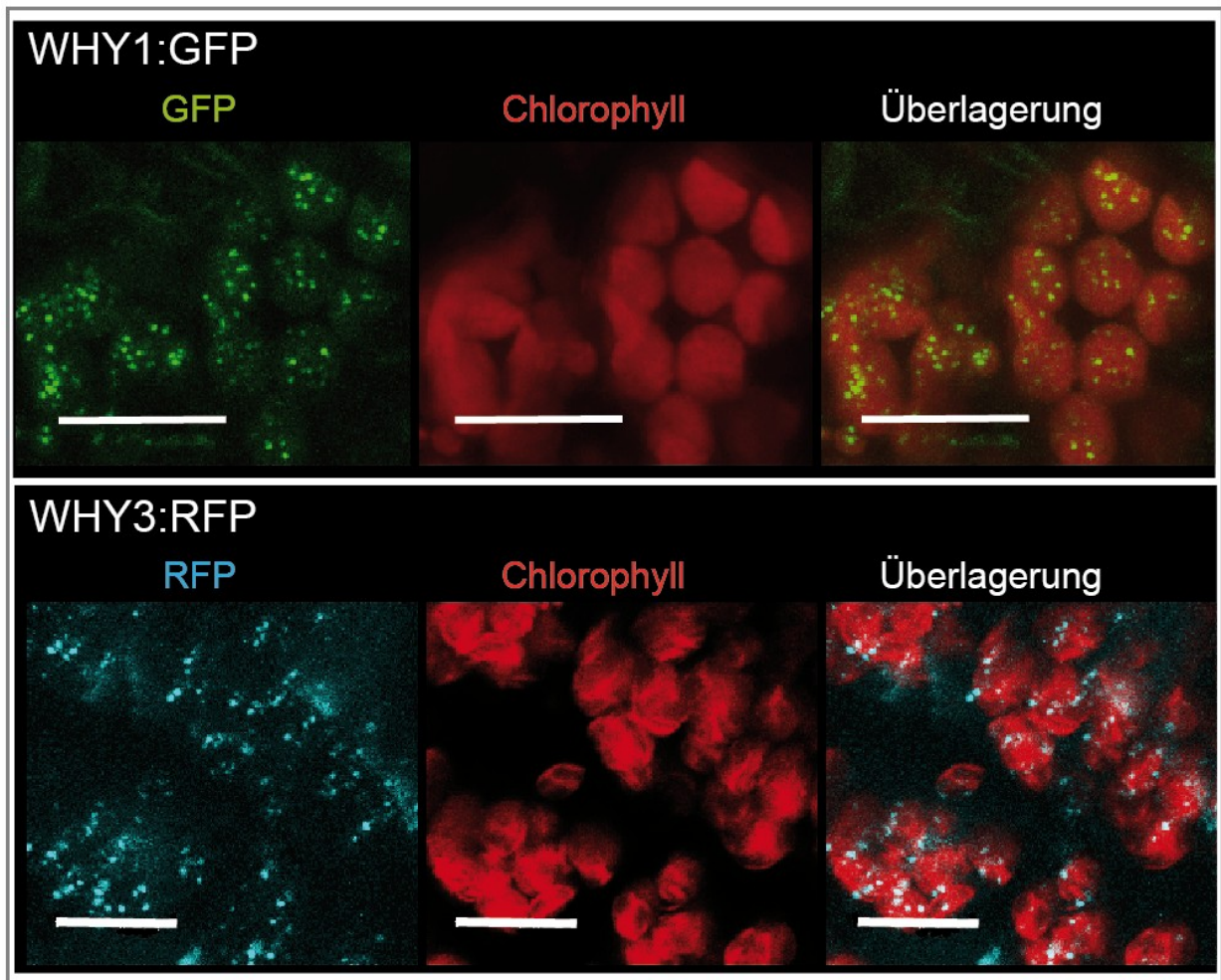


Abb. E7: Subzelluläre Lokalisierung von WHIRLY1:GFP- und WHIRLY3:RFP-Fusionsproteinen in Mesophyllzellen junger Rosettenblätter von stabil transformierten Linien. Gezeigt sind das Fluoreszenzsignal (links) und die Autofluoreszenz der Chloroplasten (Mitte) sowie eine Überlagerung der beiden Signale (rechts). Die Schichttiefe in Z-Richtung beträgt 7,1 µm (WHY1:GFP) bzw. 6,9 µm (WHY3:RFP). Messbalken = 10 µm

Die Fluoreszenzsignale wurden in Mesophyllzellen junger Rosettenblätter mittels konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie betrachtet (2.4.14). In allen untersuchten Linien, die WHIRLY1 in Fusion mit GFP synthetisierten, wurden punktförmige Signale mit einer Größe von 0,4 bis 0,6 µm in den Chloroplasten detektiert (Abb. E7). Zusätzlich waren auch deutlich kleinere Punkte vorhanden. Die kleineren Punkte waren fast immer mit der roten Chlorophyllfluoreszenz kolokalisiert, die größeren Punkte teilweise nicht. Es wurden keine Signale detektiert, die auf eine Kernlokalisierung des WHIRLY1-Proteins hindeuten. Die Untersuchungen an stabil transformierten Linien bestätigten somit die Annahme, dass WHIRLY1 in Fusion mit GFP nicht in den Zellkern gelangen kann.



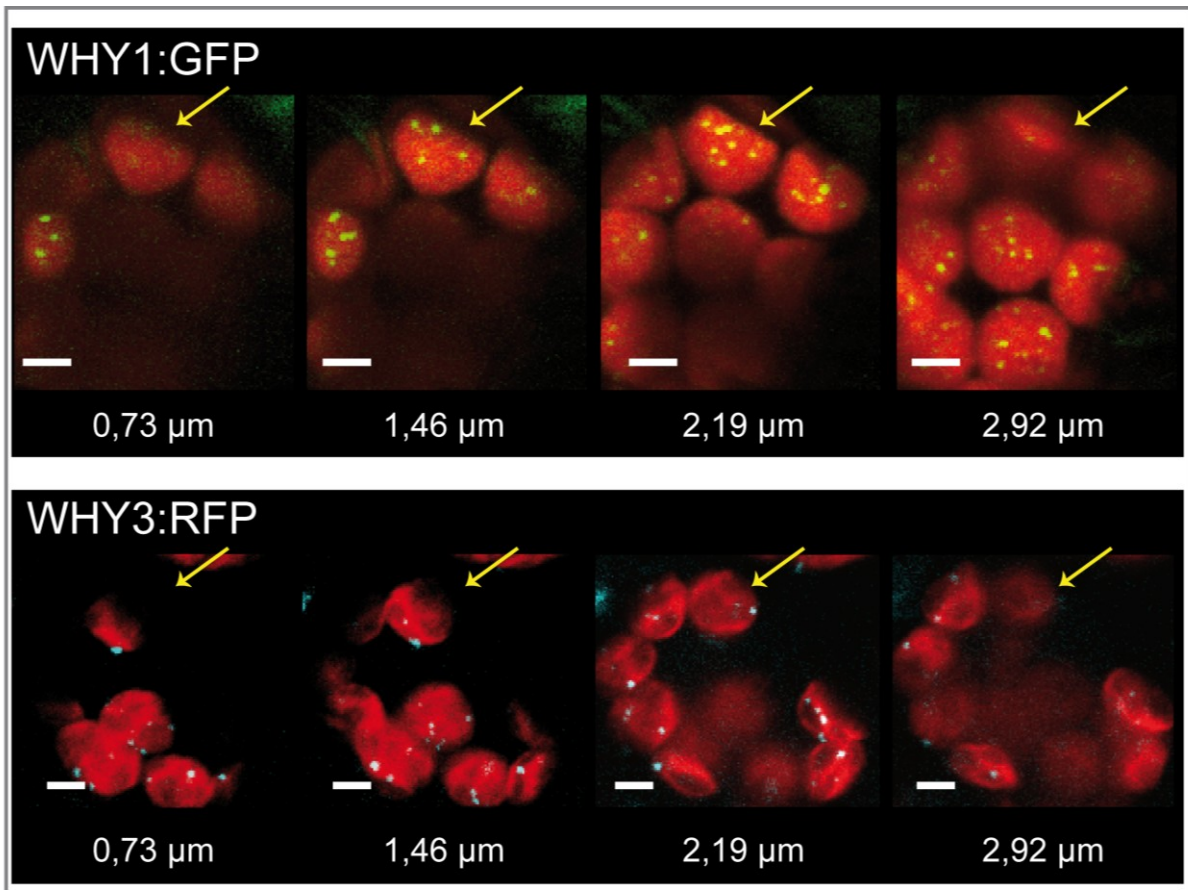


Abb. E8: Lokalisierung der WHIRLY1:GFP- und WHIRLY3:RFP-Fusionsproteine in Chloroplasten aus jungen Rosettenblättern von stabil transformierten Linien. Gezeigt sind Überlagerungen des Fluoreszenzsignals mit der Autofluoreszenz der Chloroplasten. Vier aufeinanderfolgende *Z-stacks* mit einer Schichttiefe von jeweils 0,73 µm sind nebeneinander abgebildet. Der gelbe Pfeil markiert einen Chloroplasten, der in den vier *Z-stacks* in verschiedenen Schnittebenen sichtbar ist. Messbalken = 2,5 µm

Auch das Signal des WHIRLY3:RFP-Fusionsproteins war in Mesophyllzellen junger Rosettenblätter von stabil transformierten Linien nicht im Zellkern nachweisbar (Abb. E7). Eine Kernlokalisierung des nativen WHIRLY3-Proteins ist jedoch zu erwarten, da WHIRLY3 als Teil eines Transkriptionsfaktors im Zellkern beschrieben wurde (Xiong et al., 2009). Die WHIRLY3:RFP-Fluoreszenzsignale konnten in den Chloroplasten beobachtet werden und zeigten, ähnlich wie WHIRLY1:GFP, ein punktförmiges Muster (Abb. E7). Es waren größere Punkte mit einem Durchmesser von 0,4 bis 0,6 µm detektierbar, wobei häufig eine Lokalisation knapp außerhalb der roten Chlorophyllfluoreszenz erkennbar war. Die Lokalisation von WHIRLY1:GFP und WHIRLY3:RFP innerhalb der Chloroplasten wurde durch Serien von *Z-stacks* bestätigt (Abb. E8). Beide Signale sind auch in Bildern mit einer geringen Schichttiefe in *Z*-Richtung (0,73 µm) im Bereich der roten Chlorophyllfluoreszenz zu erkennen.

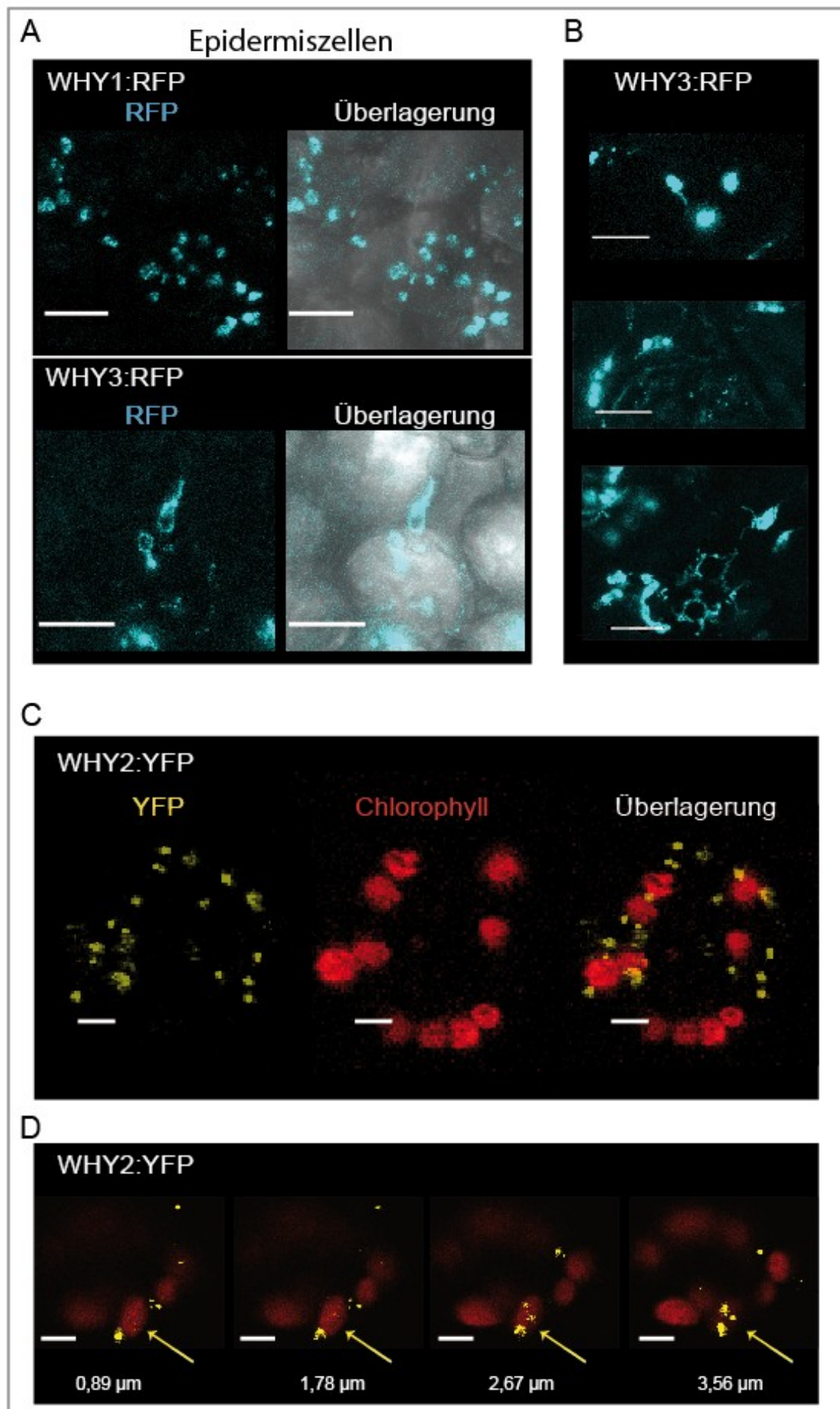
Zusätzlich zu den Mesophyllzellen wurde die Blattepidermis mikroskopiert (Abb. E9A, B). Stabil transformierte Linien, die WHIRLY1 in Fusion mit RFP synthetisierten, zeigten in Blattepidermiszellen ein ähnliches Fluoreszenzsignal, wie es für

WHIRLY1:GFP in Mesophyllzellen beobachtet wurde. Die WHIRLY1:RFP-Fluoreszenzsignale waren punktförmig, und es wird auf Grund der Größe, Form und Verteilung der Signale angenommen, dass sie in den Leukoplasten der Epidermis lokalisiert sind (Abb. E9A). Es wurden keine Signale gefunden, die auf eine Lokalisation außerhalb der Plastiden hindeuteten. In den Epidermiszellen der WHIRLY3:RFP-Linien wurden allerdings neben den Signalen, die auf eine Lokalisation in Plastiden hinweisen, noch weitere Fluoreszenzsignale beobachtet. So war das WHIRLY3:RFP Fluoreszenzsignal in Plastidenfortsätzen detektierbar, die Stromuli (Krupinska et al., 2010) ähneln (Abb. E9A, B). Zusätzlich waren auch sehr kleine punktförmige Signale in unmittelbarer Nähe zu Plastiden, aber auch in einiger Entfernung zu diesen vorhanden, bei denen es sich um Mitochondrien handeln könnte. Folglich könnte WHIRLY3 dual in Plastiden und Mitochondrien lokalisiert sein.

Im Unterschied zu den plastidären Proteinen WHIRLY1 und WHIRLY3 ist das WHIRLY2-Protein in Mitochondrien lokalisiert (Krause et al., 2005; Janicka et al., 2012). Um eine mögliche Lokalisation von WHIRLY3 in Mitochondrien zu prüfen, kamen stabil transformierte Linien zum Einsatz, die WHIRLY2 in Fusion mit YFP (*yellow fluorescent protein*) synthetisieren (2.2.1). Die WHIRLY2:YFP-Fluoreszenzsignale wurden mit den WHIRLY3:RFP-Fluoreszenzsignalen verglichen. Mikroskopische Untersuchungen an jungen Rosettenblättern zeigten punktförmige WHIRLY2:YFP-Fluoreszenzsignale, die außerhalb des Bereiches der Autofluoreszenz der Chloroplasten detektiert wurden und eine Größe von 0,4 bis 0,6  $\mu\text{m}$  hatten (Abb. E9C). Somit haben die WHIRLY2:YFP- und die WHIRLY3:RFP-Signale ähnliche Größen. Die Lokalisation der WHIRLY2:YFP-Fusionsproteine außerhalb der Chloroplasten wurde durch eine Serie von *Z-stacks* bestätigt (Abb. E9D). Der direkte Vergleich der Größe, Form und Lokalisation der WHIRLY2:YFP und WHIRLY3:RFP Signale deutet darauf hin, dass zumindest ein Teil der WHIRLY3-Proteine in Mitochondrien lokalisiert sein könnte (Abb. E7, E9).

Legende zur Abbildung auf der nächsten Seite:

Abb. E9: Subzelluläre Lokalisierung von WHIRLY1:RFP-, WHIRLY3:RFP- und WHIRLY2:YFP-Fusionsproteinen in jungen Rosettenblättern von stabil transformierten Linien. **A** Gezeigt sind das RFP-Signal (links) sowie dessen Überlagerung mit dem Transmissionsbild (rechts) in Epidermiszellen. Die Schichttiefe in Z-Richtung beträgt 6,5  $\mu\text{m}$  (WHY1:RFP) und 5,12  $\mu\text{m}$  (WHY3:RFP). **B** Detailansicht des WHIRLY3:RFP-Fluoreszenzsignals in Epidermiszellen. Die Schichttiefen in Z-Richtung betragen von oben nach unten 5,9  $\mu\text{m}$ , 5,12  $\mu\text{m}$  und 7,1  $\mu\text{m}$ . **C** Gezeigt sind das YFP-Signal (links) und die Autofluoreszenz der Chloroplasten (Mitte) sowie eine Überlagerung der beiden Signale (rechts). Die Schichttiefe in Z-Richtung beträgt 1,24  $\mu\text{m}$ . **D** Vier aufeinanderfolgende *Z-stacks* mit einer Schichttiefe von jeweils 0,89  $\mu\text{m}$  sind nebeneinander abgebildet. Gezeigt sind Überlagerungen des Fluoreszenzsignals mit der Autofluoreszenz der Chloroplasten. Der gelbe Pfeil markiert jeweils einen Chloroplasten, der in den vier *Z-stacks* in verschiedenen Schnittebenen sichtbar ist. Messbalken = 10  $\mu\text{m}$  (A,B) bzw. 2,5  $\mu\text{m}$  (C,D)



### 3.1.5 Herstellung und Charakterisierung eines Antikörpers gegen WHIRLY3

Mikroskopische Analysen von transgenen Linien, die WHIRLY3 in Fusion mit RFP akkumulieren, weisen auf eine duale Lokalisation des WHIRLY3-Proteins von *A. thaliana* in Mitochondrien und Plastiden hin (3.1.4). Um das native Protein in der Zelle nachweisen zu können, wurde ein Antikörper gegen das WHIRLY3-Protein hergestellt.

Ein Aminosäuresequenzvergleich von WHIRLY1 und WHIRLY3 von *A. thaliana* ergab, dass die Proteine zu 79,1 % aus identischen und zu weiteren 12,7 % aus ähnlichen Aminosäuren bestehen (Abb. E10), was eine eindeutige Unterscheidung mit Hilfe eines Antikörpers erschwert. Auf Grund der hohen Ähnlichkeit der beiden plastidären WHIRLY-Proteine musste für die Synthese eines WHIRLY3-Antikörpers zunächst eine Peptidsequenz identifiziert werden, die spezifisch für WHIRLY3 ist, das heißt im WHIRLY1-Protein nicht vorkommt.

WHIRLY3	MSQLLSPPMAVFSKTFINHKFSDARFLSSHILTSGGFAGK--IIPLKPTAR--LKLTV
WHIRLY1	MSQLLSTPLMAVN-----SNPRFLSSSVLVTGGFAVKRHGFALKPTTKTVKLFSV
	*****:* *** *:.*.***** *:.*:*** * :.*.*****: :.*.***
WHIRLY3	KSRQSDYFEKQRFQDSSSSQN-AEVSSPRFYVGHHSIYKGKAALTIEPRAPEFVALES
WHIRLY1	KSRQTDYFEKQRFQDSSSSSPSPAEGLPARFYVGHHSIYKGKAALTVDPRAPFVALD
	****:*****. ** :.*.*****: :*****:****
WHIRLY3	KLTKEGFLLLQFAPAAGVRQYDWSRKQVFSLSVTEIGNLVSLGPRESCEFFHDPFKGKS
WHIRLY1	KLTKDGFLLLQFAPSAGVRQYDWSKKQVFSLSVTEIGTLVSLGPRESCEFFHDPFKGK-S
	*:.*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*
WHIRLY3	DEGKVRKVLKVEPLPDGSGRFFNL SVQNKLLNVDES VYIPITKAEFAVLISAFNFVLP
WHIRLY1	DEGKVRKVLKVEPLPDGSGHFFNL SVQNKLVNVDESIYIPITRAEFAVLISAFNFVLP
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*
WHIRLY3	IGWSAFANSIKPE <b>EDSNRLNNASPKY</b> EGDYEW
WHIRLY1	IGWHAFANSIKPEETSRVNNASPNYGGDYEW
	*** *****: :.*:*****:*****:*

WHIRLY3 Vorstufenprotein: 29,73 kDa; prozessiertes WHIRLY3: 26,37 kDa bzw. 21,45 kDa  
WHIRLY1 Vorstufenprotein: 29,06 kDa; prozessiertes WHIRLY1: 25,94 kDa bzw. 24,06 kDa

Abb. E10: Aminosäuresequenzvergleich der Proteine WHIRLY1 und WHIRLY3 von *A. thaliana*. Die Peptidsequenz, welche für die Synthese eines WHIRLY3-Antikörpers genutzt wurde, ist eingerahmt. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern gekennzeichnet. Doppelpunkte und Punkte bezeichnen Aminosäuren mit sehr ähnlichen bzw. teilweise ähnlichen chemischen Eigenschaften. Vorhersagen für die Prozessierungsstellen wurden mit den Programmen iPSORT (blaue Pfeile) und ChloroP1.1 (grüne Pfeile) erstellt. Der Sequenzvergleich erfolgte mit ClustalW2.

Die deutlichsten Sequenzunterschiede konnten im aminoterminalen Bereich der beiden Proteine gefunden werden (Abb. E10). Peptidsequenzen aus diesem Bereich sind jedoch für die Antikörpersynthese nicht relevant, da hier die plastidäre Importsequenz liegt, die nach Import des Proteins in die Plastiden abgespalten wird. Die



genaue Prozessierungsstelle von WHIRLY3 konnte mit Hilfe von Vorhersageprogrammen zwar nicht eindeutig bestimmt werden, aber es ist zu erwarten, dass sie zwischen der 30. und 75. Aminosäure liegt (Abb. E10). Untersuchungen zum Import in die Plastiden ergaben für WHIRLY1 und WHIRLY3 eine ähnliche Größe von etwa 24 kDa (unveröffentl. Daten K. Krause). Für die Erstellung des Peptidantikörpers wurde die im C-terminalen Bereich des WHIRLY3-Proteins befindliche Aminosäuresequenz EDSNRLNNASPKY als Epitop verwendet (Abb. E10). Ein Sequenzvergleich mit dem Proteom von *A. thaliana* ergab, dass nur das WHIRLY3-Protein diese Peptidsequenz besitzt und sie somit für die Herstellung eines spezifischen WHIRLY3-Antikörpers geeignet ist.

Die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers erfolgte in Kaninchen (BioGenes, Berlin). Das Rohserum wurde über eine Affinitätssäule aufgereinigt (2.5.9.5). Zur Unterscheidung vom Rohserum wird hier nur der aufgereinigte WHIRLY3-Peptidantikörper als  $\alpha$ -WHIRLY3 bezeichnet.  $\alpha$ -WHIRLY3 wurde auf seine Sensitivität und Spezifität hin untersucht. Um die Sensitivität zu testen, wurden verschiedene Mengen des Peptides (0 bis 1000 ng), gegen das der WHIRLY3-Antikörper gerichtet ist, mittels des *dot-blot* Verfahrens auf Membranstreifen aufgetragen (2.5.9.5). Die Streifen wurden jeweils mit dem Rohserum des WHIRLY3-Antikörpers, mit  $\alpha$ -WHIRLY3 sowie zur Kontrolle ohne einen Primärantikörper immundekoriert (2.5.9.3). Bei Verwendung des Rohserums konnte das WHIRLY3-Peptid bis zu einer Menge von 100 ng nachgewiesen werden (Abb. E11). Mit  $\alpha$ -WHIRLY3 konnte man 0,1 ng des Peptides nachweisen, womit die Empfindlichkeit von  $\alpha$ -WHIRLY3 1000-mal höher als die des unaufgereinigten Rohserums ist. Die Kontrolle ohne spezifischen Antikörper ergab lediglich schwache Hintergrundsignale bei der größten Peptidmenge von 1000 ng (Abb. E11).

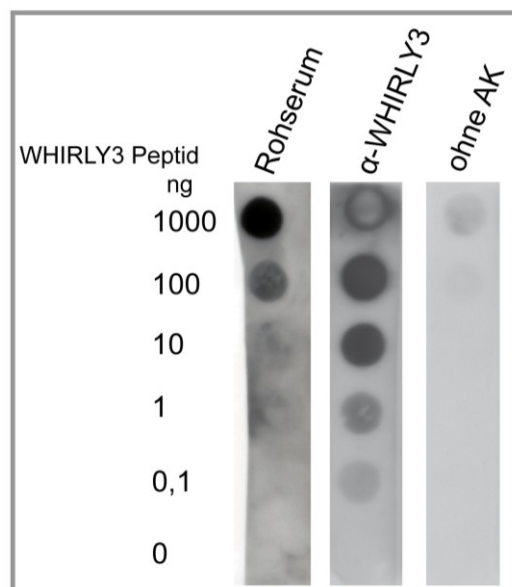


Abb. E11: Sensitivität des gegen das WHIRLY3-Protein gerichteten Peptidantikörpers. Mittels des *dot-blot* Verfahrens wurden 0,1 bis 1000 ng des Peptides, gegen das der WHIRLY3-Antikörper gerichtet ist, auf Membranstreifen immobilisiert. Diese wurden mit dem Rohserum des WHIRLY3-Antikörpers, dem aufgereinigten WHIRLY3-Antikörper ( $\alpha$ -WHIRLY3) sowie zur Kontrolle ohne primären Antikörper (AK) immundekoriert.

Um die Spezifität von  $\alpha$ -WHIRLY3 zu testen, wurden Zellen von *E. coli* verwendet, welche die Sequenz für ein rekombinantes WHIRLY3-Protein in Fusion mit einem C-Myc-Tag überexprimieren (Anhang Abb. A1, A2). Proteine aus 5, 10 und 20  $\mu$ l der lysierten *E. coli* Kulturen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.5.7) und unter Verwendung der Western Blot Methode auf Membranen immobilisiert (2.5.9.1). Zwei der Membranen wurden jeweils mit dem Präimmunserum bzw.  $\alpha$ -WHIRLY3 behandelt. Mit dem Präimmunserum wurden keine spezifischen Banden nachgewiesen, wohingegen mit  $\alpha$ -WHIRLY3 eine Bande in der Größe des rekombinanten WHIRLY3-Proteins detektierbar war (Abb. E12). Darüber hinaus wurde eine Immundetektion mit einer  $\alpha$ -WHIRLY3-Lösung durchgeführt, die zuvor entweder mit 1  $\mu$ g/ml WHIRLY3-Peptid oder 1  $\mu$ g/ml Rinderserumalbumin (BSA) für 1 Std. vorinkubiert wurde. Nach einer Vorinkubation mit dem WHIRLY3-Peptid konnten keine Banden nachgewiesen werden (Abb. E12). Die Vorinkubation mit BSA führte zwar zu einer Reduktion der ECL-Signalstärke, es sind jedoch nach wie vor die Banden des rekombinanten WHIRLY3-Proteins zu erkennen. Der WHIRLY3-Antikörper bindet somit spezifisch an das WHIRLY3-Peptid.

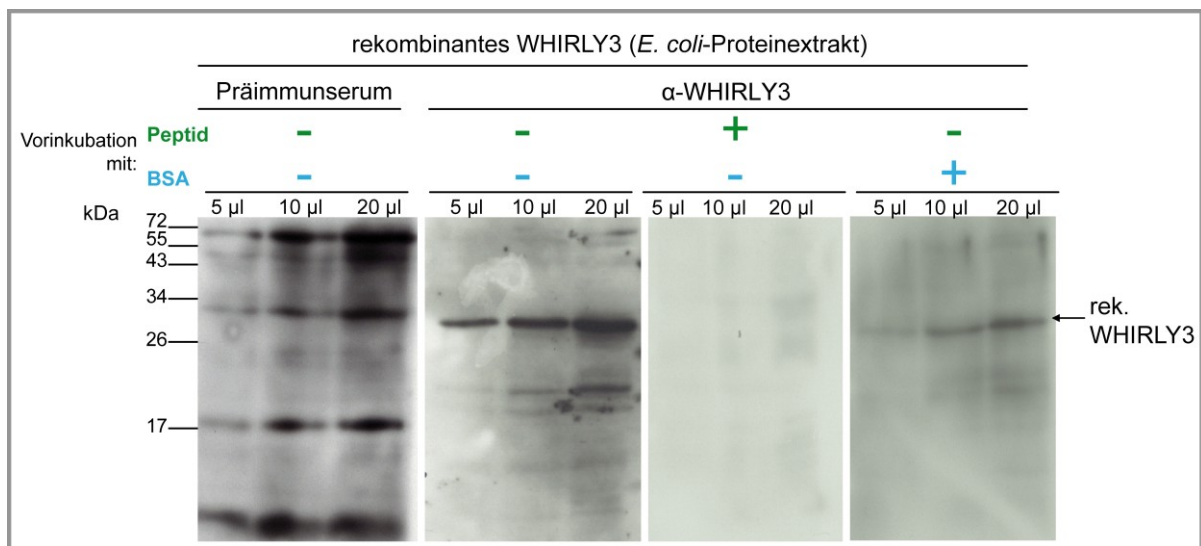


Abb. E12: Spezifität von  $\alpha$ -WHIRLY3. Auf vier Membranen wurden Proteine aus jeweils 5, 10 und 20  $\mu$ l einer lysierten *E. coli* Kultur immobilisiert. Die Bakterien synthetisierten ein rekombinantes WHIRLY3-Protein. Die Immundetektion erfolgte jeweils mit dem Präimmunserum des WHIRLY3-Peptidantikörpers,  $\alpha$ -WHIRLY3 bzw. zweier  $\alpha$ -WHIRLY3-Lösungen, die mit 1  $\mu$ g/ml WHIRLY3-Peptid bzw. mit 1  $\mu$ g/ml BSA für 1 Std. vorinkubiert wurden (von links nach rechts).

Um zu prüfen, ob  $\alpha$ -WHIRLY3 in Proteinproben von *A. thaliana* spezifisch das native WHIRLY3-Protein erkennt, wurden Gesamtproteinextrakte (2.5.1) aus sechs Tage alten Keimlingen des Wildtyps verwendet. Zusätzlich wurden Gesamtproteinextrakte aus Keimlingen der Mutanten, denen jeweils eines der drei WHIRLY-Proteine fehlt (*why1-1*, *why2*, *til-why3*), und aus einer transgenen Linie, welche das WHIRLY2-Protein in Fusion mit YFP synthetisiert (WHIRLY2:YFP), eingesetzt (2.2.1). Im Gesamtproteinextrakt aus Keimlingen des Wildtyps war eine Bande detektierbar, deren

Größe mit der theoretischen Größe des prozessierten WHIRLY3-Proteins in Plastiden (zwischen 21 und 26 kDa, vergleiche Abb. E10) und der mittels Importassays experimentell ermittelten Größe von ca. 24 kDa (unveröffentl. Daten K. Krause) etwa übereinstimmt (Abb. E13). In dem Proteinextrakt aus Keimlingen der *til-why3*-Mutante war WHIRLY3 nicht detektierbar. In den Proteinextrakten aus Keimlingen der Mutanten *why1-2* und *why2* war WHIRLY3 in gleicher Stärke wie im Wildtyp nachweisbar, und in der transgenen Linie WHIRLY2:YFP war keine zusätzliche Bande mit der Größe des rekombinanten WHIRLY2-Proteins detektierbar (Abb. E13).  $\alpha$ -WHIRLY3 erkennt somit spezifisch WHIRLY3 in Proteinextrakten von *A. thaliana* und nicht die nahe verwandten Proteine WHIRLY1 und WHIRLY2. Zusätzlich wurden in allen Proteinextrakten noch zwei Banden mit einer Größe von etwa 55 kDa bzw. etwa 16 kDa detektiert (Abb. E13). Da diese Banden in allen Genotypen gleich stark auftreten, handelt es sich wahrscheinlich um unspezifische Signale.

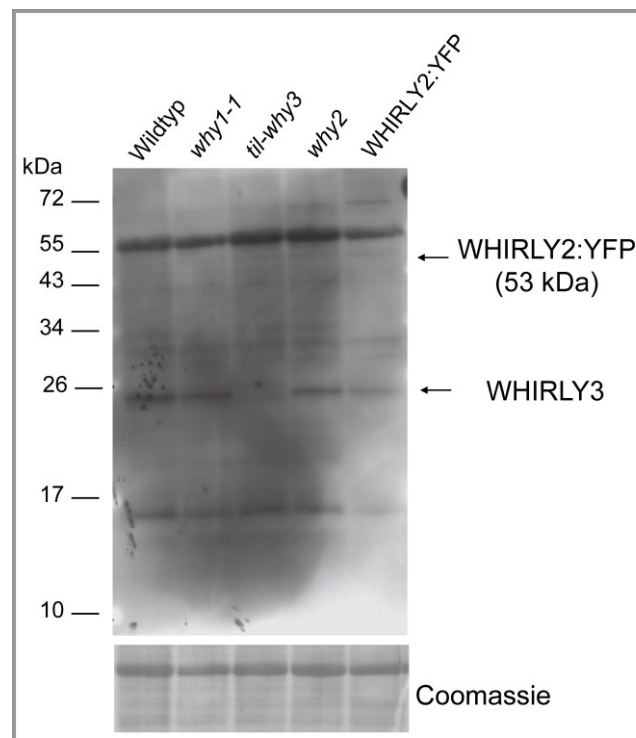


Abb. E13: Immunologischer Nachweis von WHIRLY3 in Proteinextrakten aus sechs Tage alten Keimlingen des Wildtyps von *A. thaliana* und der Mutanten *why1-1*, *why2* und *til-why3* sowie der transgenen Linie WHIRLY2:YFP. Die Immundekoration erfolgte mit  $\alpha$ -WHIRLY3. Als Beladungskontrolle wurde ein vergleichbares Gel mit Coomassie-Brillantblau gefärbt.

#### 3.1.6 Immunologische Untersuchungen zur Lokalisierung von WHIRLY3

WHIRLY3:RFP-Fusionsproteine waren sowohl in Plastiden als auch in Zellkompartimenten nachweisbar, bei denen es sich um Mitochondrien handeln könnte (3.1.4). Um diese unerwartete duale Lokalisation zu prüfen, wurden immunologische Untersuchungen mit  $\alpha$ -WHIRLY3 (3.1.5) durchgeführt. Ein Gesamtproteinextrakt aus Rosettenblättern von vier Wochen alten Pflanzen des Wildtyps von *A. thaliana* wurde

zusammen mit einer Chloroplastenfraktion (2.5.2.1) sowie einer Fraktion, in der Mitochondrien angereichert waren (2.5.3) mittels der Western Blot Methode analysiert (2.5.9). Überraschenderweise wurde in der Chloroplastenfraktion anstelle des erwarteten Proteins mit einer Größe von etwa 24 kDa eine Bande mit einer Größe von 30 kDa nachgewiesen (Abb. E14A). Bei dieser Bande könnte es sich um das unprozessierte WHIRLY3-Vorstufenprotein handeln, welches eine theoretische Größe von 29,73 kDa hat. Bei weiteren immunologischen Untersuchungen an Chloroplastenfraktionen aus verschiedenen Anzuchten des Wildtyps von *A. thaliana* zeigte sich, dass Chloroplasten neben dem möglichen WHIRLY3-Vorstufenprotein auch das prozessierte WHIRLY3-Protein enthalten können (Anhang Abb. A3). Wie viel von welcher Form nachweisbar ist, könnte von den Anzuchtbedingungen abhängen. Im Rahmen der Arbeiten konnte jedoch nicht geklärt werden, welche Bedingungen zu einer Prozessierung des WHIRLY3-Vorstufenproteins führen.

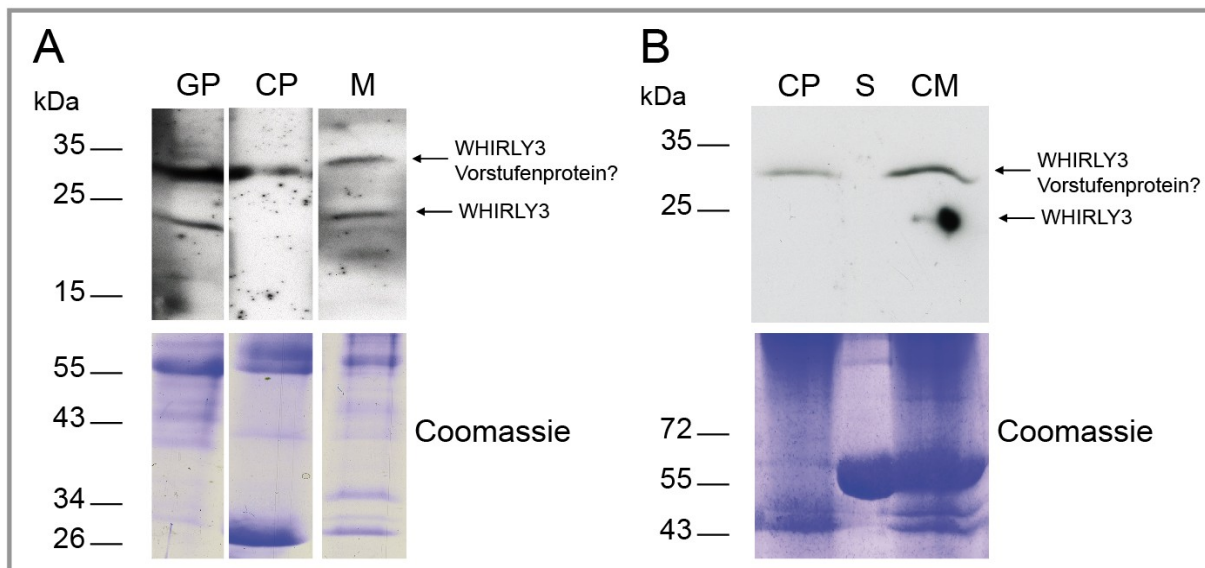


Abb. E14: Immunologischer Nachweis des WHIRLY3-Proteins. **A** Es wurde ein Gesamtproteinextrakt (GP) sowie Proteinextrakte aus Chloroplasten (CP) und aus einer Fraktion, in der Mitochondrien angereichert wurden (M) aus Rosettenblättern von Pflanzen des Wildtyps von *A. thaliana* untersucht. **B** Eine Stroma- (S) und eine Membranfraktion (CM) wurden aus Chloroplasten (CP) isoliert. Die Immundetektion erfolgte mit  $\alpha$ -WHIRLY3. Vergleichbare Gele wurden mit Coomassie-Brillantblau gefärbt.

In der Mitochondrienfraktion waren sowohl die 30 kDa Bande des möglichen WHIRLY3-Vorstufenproteins als auch die 24 kDa Bande des prozessierten WHIRLY3-Proteins detektierbar (Abb. E14A). Da es sich bei der Fraktion allerdings nicht um eine reine Mitochondrienfraktion handelte, könnten die Banden auf Grund von Verunreinigungen mit Proteinen aus Chloroplasten oder anderen Kompartimenten nachweisbar sein. Es könnte sein, dass Mitochondrien zumindest die prozessierte Form des WHIRLY3-Proteins enthalten.

Beim Import in die Plastiden passieren Vorstufenproteine die äußere und innere Hüllmembran des Organells (Flores-Pérez und Jarvis, 2013). Es wäre denkbar, dass das WHIRLY3-Vorstufenprotein nicht vollständig in die Chloroplasten importiert wird,

aber mit der Hüllmembran assoziiert ist. Um dies zu klären, wurden Chloroplasten in Stroma und Membranen fraktioniert (2.5.2.3). Proteine aus den Fraktionen wurden immunologisch mit  $\alpha$ -WHIRLY3 untersucht. Die 30 kDa Bande war nur in der Membranfraktion und nicht im Stroma nachweisbar. Somit scheint das mögliche WHIRLY3-Vorstufenprotein in Chloroplasten mit Membranen assoziiert zu sein.

Um zu prüfen, ob das WHIRLY3-Vorstufenprotein nur locker an die äußere Hüllmembran bindet oder sich bereits im Importapparat befindet, erfolgte eine Behandlung von Chloroplasten mit Thermolysin. Wenn ein Protein durch eine oder beide Hüllmembranen geschützt ist, werden größere Mengen der Peptidase Thermolysin für den Abbau benötigt. Während die Menge des TOC75-Proteins, welches Bestandteil des Importapparates in der äußeren Plastidenhüllmembran ist (Flores-Pérez und Jarvis, 2013), bereits bei einer Thermolysinkonzentration von 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  abnimmt, wurde das vermutliche WHIRLY3-Vorstufenprotein erst bei einer Konzentration von 1 bis 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  abgebaut (Abb. E15). Somit ist das vermutliche WHIRLY3-Vorstufenprotein nicht an die äußeren Hüllmembran der Plastiden gebunden, sondern entweder in bzw. an der inneren Hüllmembran oder bereits innerhalb der Chloroplasten lokalisiert.

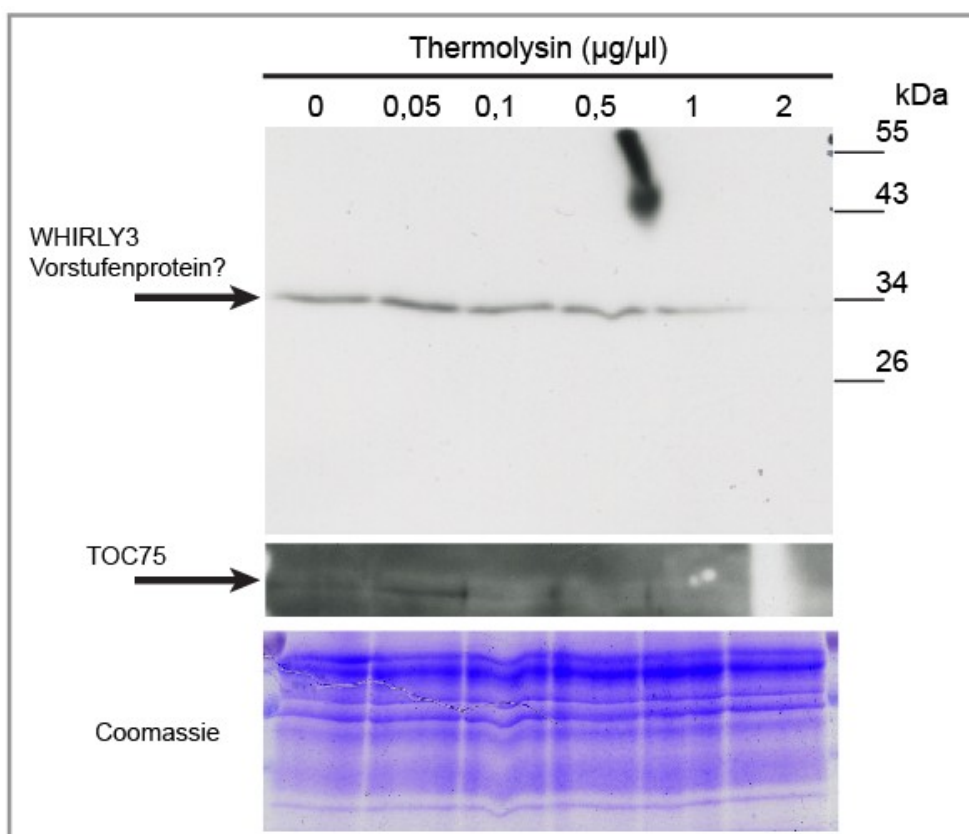


Abb. E15: Thermolysinbehandlung von isolierten Chloroplasten aus Rosettenblättern des Wildtyps von *A. thaliana*. Thermolysin wurde in einer Konzentration von 0,05 bis 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingesetzt. Nach SDS-PAGE und Blot des Gels erfolgte ein immunologischer Nachweis des WHIRLY3-Proteins und des TOC75-Proteins. Als Beladungskontrolle wurde ein vergleichbares Gel mit Coomassie-Brillantblau gefärbt.

## 3.2 Identifizierung von Interaktionspartnern des WHIRLY3-Proteins

Durch Identifizierung von Interaktionspartnern, deren subzelluläre Lokalisation und Funktion bereits bekannt sind, könnten weitere Hinweise auf die Lokalisation und auf die Funktion der WHIRLY-Proteine erhalten werden. Für das WHIRLY1-Protein von *A. thaliana* wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit mit Hilfe des Hefe-2-Hybridsystems eine Reihe von Interaktionspartnern identifiziert (unveröffentl. Daten Y. Miao). Da WHIRLY1 und WHIRLY3 zu fast 80 % aus identischen Aminosäuren bestehen und beide in Plastiden akkumulieren, könnten die beiden Proteine mit ähnlichen oder gleichen Partnern interagieren, wobei besonders Plastidenproteine als Interaktionspartner erwartet werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden nun Interaktionspartner des WHIRLY3-Proteins mit Hilfe des Hefe-2-Hybridsystems identifiziert und mit den bekannten WHIRLY1-Interaktionspartnern verglichen.

### 3.2.1 Hefe-2-Hybridsystem

Zunächst wurde eine cDNA-Bank aus RNA von Rosettenblättern des Wildtyps von *A. thaliana* in Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) exprimiert (2.6.6). Für die Durchmusterung der cDNA-Bank wurde ein Fusionsprotein aus WHIRLY3 und der GAL4-DNA-Bindedomäne, das sogenannte *Bait*-Protein, benötigt (2.6). Zur Synthese dieses Fusionsproteins wurde ein WHIRLY3-Konstrukt in den Vektor pGBKT7, der die Sequenz für die GAL4-DNA-Bindedomäne trägt, eingebracht (2.6.3). Das WHIRLY3-Konstrukt bestand aus den Nukleotiden 214 bis 757 der für das WHIRLY3-Protein kodierenden Sequenz. Die Nukleotide 1 bis 213 wurden für die Herstellung des *Bait*-Proteins entfernt, da sie für die plastidäre Importsequenz kodieren. Eigene Voruntersuchungen zeigten, dass die Nukleotide 758 bis 807 der WHIRLY3-Sequenz, welche für eine mögliche Autoregulationsdomäne kodieren (Grabowski, 2008), zu einer Aktivierung der Reportergene in der Hefe ohne vorliegende Protein-Protein-Interaktion führen (Anhang Abb. A4). Daher wurde die entsprechende Sequenz entfernt.

Nach Durchmusterung der cDNA-Bank mit dem WHIRLY3-*Bait*-Protein wurden auf Minimalmedium Kolonien erhalten (2.6.6). Aus diesen Kolonien wurde Plasmid-DNA isoliert (2.6.5) und sequenziert, wodurch insgesamt 20 verschiedene mögliche Interaktionspartner des WHIRLY3-Proteins ermittelt wurden (Tab. E1 und Anhang Tab. A1). Je mehr Kolonien Sequenzen eines bestimmten Gens enthielten, d.h. je häufiger ein möglicher Interaktionspartner identifiziert wurde, desto wahrscheinlicher ist eine Interaktion mit WHIRLY3. Von den 20 möglichen Interaktionspartnern wurden 13 in jeweils nur einer Kolonie identifiziert und sind folglich als unspezifisch einzustufen (Anhang Tab. A1). Nur bei sieben der 20 identifizierten Proteine ist eine Interaktion mit WHIRLY3 wahrscheinlich (Tab. E1).



### 3. Ergebnisse

Tab. E1: Mögliche Interaktionspartner des WHIRLY3-Proteins, die mit dem Hefe-2-Hybridsystem identifiziert wurden. Mögliche Interaktionspartner von WHIRLY1, die bei vorangegangenen Arbeiten mit dem Hefe-2-Hybridsystem identifiziert wurden, sind gelb unterlegt.

Protein	Accession number	Anzahl der Kolonien	Lokalisation	Beschreibung	Literatur
CysC1	At3g61440	56	Mitochondrium	Cystein Synthase Isomer; Entgiftung von Cyaniden; bindet Kupferionen	García et al., 2010
L11	At3g53430	21	60S-Ribosomen	ribosomales Protein	Carroll, 2013
ACO1	At4g35830	8	Cytoplasma oder Mitochondrium	Aconitat Hydratase; katalysiert Umwandlung von Citrat zu Isocitrat; evtl. RNA-Bindeprotein	Peyret et al., 1995; Arnaud et al., 2007
CER6/CUT1	At1g68530	6	Membranen	3-Ketoacyl-CoA Synthase; Bildung von Fettsäuren	Fiebig et al., 2000; Hooker et al., 2002
unbekanntes Protein	At4g08593	6	Mitochondrium		TAIR
Xyloseisomerase	At5g57655	2	ER	Protein aus der Familie der Xyloseisomerasen	Dunkley et al., 2006; Rajjou et al., 2006
LAZ1	At4g38360	2	Cytoplasma, Plasmamembran, Vesikel	DUF300-Domäne	Malinovsky et al., 2010

Die am häufigsten identifizierten möglichen Interaktionspartner sind das CysC1-Protein und das L11-Protein der 60S-Ribosomen. Zusätzlich wurden fünf weitere Proteine in zumindest zwei Kolonien gefunden (Tab. E1). Hierzu zählen auch ACO1 und das Protein aus der Familie der Xyloseisomerasen, welche beide in vorangegangenen Untersuchungen mit dem Hefe-2-Hybridsystem als Interaktionspartner für das WHIRLY1-Protein identifiziert wurden. ACO1 und die Xyloseisomerase könnten mit beiden plastidären WHIRLY-Proteinen von *A. thaliana* interagieren.

#### 3.2.2 Koimmunpräzipitation

Mit Hilfe des Hefe-2-Hybridsystems wurden sieben Proteine identifiziert, die möglicherweise mit dem WHIRLY3-Protein von *A. thaliana* interagieren können (3.2.1). Keines dieser Proteine kommt in Plastiden vor, wo WHIRLY3 hauptsächlich lokalisiert ist (3.1). Um speziell plastidäre Interaktionspartner des WHIRLY3-Proteins zu identifizieren, wurde eine Koimmunpräzipitation mit Proteinen aus isolierten Chloroplasten und  $\alpha$ -WHIRLY3 (3.1.5) durchgeführt.

Zunächst wurden intakte Chloroplasten aus zwei Wochen alten Keimlingen des Wildtyps von *A. thaliana* isoliert. Damit  $\alpha$ -WHIRLY3 während der Koimmunpräzipitation an die Plastidenproteine binden kann, wurden die intakten Chloroplasten osmotisch aufgebrochen und die Membranproteine mit Hilfe von Digitonin solubilisiert. Anschließend wurden die Bruchstücke der Plastiden durch

Zentrifugation abgetrennt und der Überstand, der die Chloroplastenproteine enthielt, für die Koimmunpräzipitation eingesetzt (2.5.10). Um durch einen Vergleich der Bandenmuster in den beiden Immunpräzipitaten spezifische von unspezifischen Banden unterscheiden zu können, wurde die Koimmunpräzipitation sowohl mit  $\alpha$ -WHIRLY3 als auch mit dem zugehörigen Präimmunserum durchgeführt. Im  $\alpha$ -WHIRLY3-Immunpräzipitat waren fünf spezifische Banden erkennbar (Abb. E16). Zur Identifizierung wurden die Proteine in den fünf Banden zunächst mit Trypsin verdaut und die so entstandenen Peptide anschließend mittels MALDI-TOF massenspektrometrisch untersucht. Zusätzlich wurden sowohl Proteine aus den isolierten Chloroplasten als auch der Überstand nach dem osmotischen Aufbruch und Zentrifugation der Chloroplasten mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. E16A).

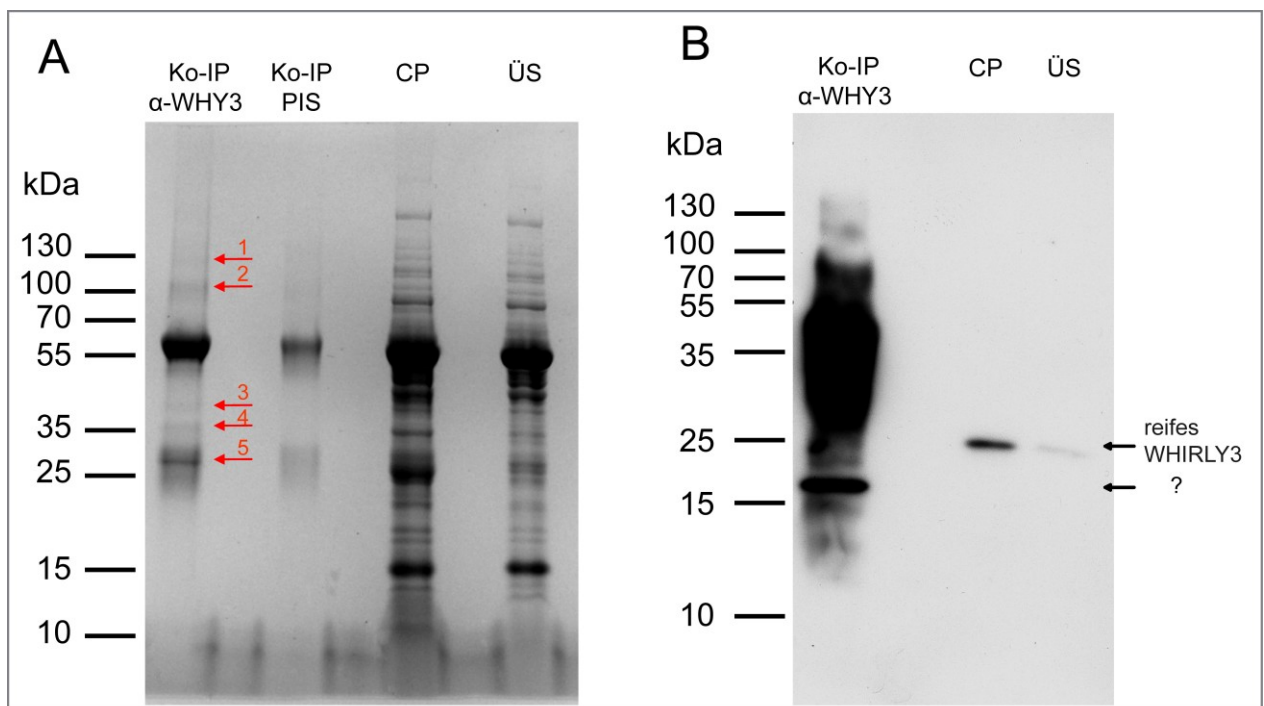


Abb. E16: **A** Eine Koimmunpräzipitation wurde mit  $\alpha$ -WHIRLY3 (Ko-IP  $\alpha$ -WHY3) sowie mit dem entsprechenden Präimmunserum (Ko-IP PIS) durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden zusammen mit Proteinen aus isolierten Chloroplasten (CP) sowie dem Überstand nach dem osmotischen Aufbruch und Zentrifugation der isolierten Chloroplasten (ÜS), welcher für die Koimmunpräzipitation verwendet wurde, mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das PA-Gel wurde mit Coomassie-Brillantblau gefärbt. Proteinbanden, die mittels Massenspektrometrie untersucht wurden, sind mit roten Pfeilen markiert und mit 1 bis 5 bezeichnet. **B** Immunologischer Nachweis des WHIRLY3-Proteins mit  $\alpha$ -WHIRLY3 in den unter A beschriebenen Proben.

Zur Kontrolle wurde ein PA-Gel, auf dem das Immunpräzipitat, die Chloroplastenproteine und der Überstand nach Lyse aufgetrennt waren, für einen Western Blot genutzt und die Membran mit  $\alpha$ -WHIRLY3 immundekoriert. Im Immunpräzipitat war eine Bande mit einer Größe von etwa 16 kDa nachweisbar (Abb. E16B). Diese Bande hatte die gleiche Größe wie eine Bande, die auch bei anderen



Immundekorationen mit  $\alpha$ -WHIRLY3 detektiert wurde (vergleiche Abb. E13, A3). Zusätzlich zeigte sich in der Spur mit dem Immunpräzipitat ein starkes Hintergrundsignal von etwa 24 bis 70 kDa, welches eventuell das Signal des prozessierten WHIRLY3-Proteins, das eine Größe von 24 kDa hat, überlagert bzw. mit einschließt (Abb. E16B). Das Hintergrundsignal könnte auf eine Kreuzreaktion des verwendeten Sekundärantikörpers mit den schweren ImmunglobulinG-Ketten von  $\alpha$ -WHIRLY3, die im Immunpräzipitat enthalten sind, zurückzuführen sein. In den Chloroplastenproteinen und im Überstand nach Lyse war hingegen das prozessierte WHIRLY3-Protein nachweisbar, wobei das Signal im Überstand deutlich schwächer war (Abb. E16B). Dies wurde auf eine unterschiedliche Beladung des Gels zurückgeführt (vergleiche Abb. E16A).

Die durch die Massenspektrometrie identifizierten Peptide aus den Banden 1 bis 5 (Abb. E16A) wurden mit der UniprotKB-Proteindatenbank ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) verglichen. Mit Ausnahme der Bande 2 konnten in allen Banden Proteine von *A. thaliana* identifiziert werden. Die Proteine aus den jeweiligen Banden wurden zusammen mit ihrem theoretischen Molekulargewicht, der Nummer des kodierenden Gens und einer Beschreibung aufgelistet (Tab. E2). Zusätzlich sind die Anzahl an identifizierten Peptiden, die eindeutig der Proteinsequenz zugeordnet werden konnten, und der *score*-Wert gezeigt. Der *score*-Wert leitet sich von dem sogenannten *ions score* ab. Dieser berechnet sich durch  $-10 * \log(P)$ , wobei P die Wahrscheinlichkeit ist, dass die gefundene Übereinstimmung des Peptides mit dem Protein aus der Datenbank zufällig ist. Zur Berechnung des *score*-Wertes werden nun die höchsten *ions scores* addiert. Je höher der *score*-Wert ist, desto spezifischer ist die Identifizierung eines Proteins. Im Anhang (Abb. A5, A6, A7, A8) sind die Aminosäuresequenzen der identifizierten Proteine zusammen mit den in den Banden gefundenen Peptiden gezeigt.

Anhand des *score*-Wertes und der Anzahl der Peptide eines Proteins, die jeweils in einer Bande gefunden wurden, lässt sich abschätzen wie spezifisch die Identifizierung dieses Proteins ist. Mögliche Interaktionspartner von WHIRLY3, für die ein hoher *score*-Wert berechnet wurde und für die viele Peptide identifizierbar waren, sind PPR4, PRPS5, FIB1a, PTAC4/VIPP1, PetA, LHCB5/CP26 und PRPS3. Weiterhin ist wichtig, zu prüfen, ob das theoretische bzw. apparente Molekulargewicht des identifizierten Interaktionspartners mit der Größe der untersuchten Bande übereinstimmt. Dies war für PPR4, FIB1a, PetA, FIB4, LHCB5/CP26 und PRPS3 der Fall. Jedoch könnten Unterschiede im theoretischen/apparenten und dem hier ermittelten Molekulargewicht der Proteine auf posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen zurückzuführen sein.

### 3. Ergebnisse

Tab. E2: Mögliche Interaktionspartner des WHIRLY3-Proteins, die durch massenspektrometrische Analyse der Proteinbanden aus Abb. E16A identifiziert wurden. Es ist das theoretische Molekulargewicht (the. MW) der Proteine angegeben. Das apparente Molekulargewicht ist falls bekannt in der Beschreibung gezeigt. Die Größe der Banden im Gel ist in Klammern angegeben. „# Pep.“: Anzahl gefundener Peptide, die eindeutig der Proteinsequenz zugeordnet werden konnten.

Protein	the. MW (kDa)	Accession number	# Pep.	score-Wert	Beschreibung	Literatur
<b>Bande 1 (120-125 kDa)</b>						
PPR4	106,7	At5g04810	7	212	enthält eine PPR-Domäne; bindet an RNA; Bestandteil des TAC	Schmitz-Linneweber et al., 2006; Pfalz et al., 2006
ClpC1	103,4	At5g50920	2	41,85	Chaperon der Clp-Protease; Bestandteil des TAC; 96 kDa	Zheng et al., 2002; Melonek et al., 2012; Majeran et al., 2012
<b>Bande 3 (40 kDa)</b>						
PRPS5	32,6	At2g33800	7	216,03	struktureller Bestandteil der plastidären 70S-Ribosomen; bindet an RNA; Bestandteil des TAC	Yamaguchi und Subramanian, 2000; Melonek et al., 2012
PTAC4/ VIPP1	36,4	At1g65260	6	258,52	wichtig für die Bildung der Thylakoidmembran; Bestandteil des TAC; 36 und 37 kDa große Formen vorhanden	Kroll et al., 2001; Pfalz et al., 2006; Zhang et al., 2012
BCCP1/ CAC1A	29,6	At5g16390	2	43,28	Biotin-Carboxyl-Carrier-Untereinheit der plastidären Acetyl-CoA Carboxylase	Li et al., 2010
<b>Bande 4 (35 kDa)</b>						
FIB1a	28,8	At4g04020	4	149,44	Fibrillin; lokalisiert in Plastoglobuli und Thylakoidmembran; 24–30 kDa	Singh und McNellis et al., 2011
PetA	35,3	AtCg00540	3	102,56	Cytochrom-f-Apoprotein	Mitchel, 1961
FIB4	22,9	At3g23400	2	30,4	Fibrillin; lokalisiert in Plastoglobuli und Thylakoidmembran; 25-27 kDa	Singh und McNellis et al., 2011
<b>Bande 5 (27 kDa)</b>						
LHCB5/ CP26	30,1	At4g10340	5	206,41	Apoprotein des LHCB; 26 kDa	Jansson, 1999
PRPS3	25,2	AtCg00800	4	150,96	struktureller Bestandteil der plastidären 70S Ribosomen; Bestandteil des TAC	Yamaguchi et al., 2002; Pfalz et al., 2006

### 3.3 Untersuchungen zur Funktion der WHIRLY-Proteine von *Arabidopsis thaliana*

Die nahe verwandten Proteine WHIRLY1 und WHIRLY3 weisen unterschiedliche Lokalisationen in der Zelle (3.1) und unterschiedliche Interaktionspartner (3.2) auf. Um zu prüfen, ob die beiden Proteine die gleichen Funktionen haben, wurden Untersuchungen zur Genexpression durchgeführt und Mutanten analysiert. Zusätzlich wurde auch das WHIRLY2-Protein hinsichtlich seiner Funktion untersucht

#### 3.3.1 Expression von WHIRLY-Genen

Um erste Hinweise auf die Funktionen der WHIRLY-Proteine von *A. thaliana* zu erhalten, wurden Expressionsanalysen durchgeführt, indem die Transkriptmengen der entsprechenden Gene ermittelt wurden. Weist ein Gen in einem bestimmten Entwicklungsstadium, nach einer Behandlung, in einer Mutante oder in einem besonderen Gewebe oder Organ eine erhöhte Transkriptmenge auf, so kann gerade hier das zugehörige Protein eine Funktion übernehmen.

##### 3.3.1.1 Transkriptmengen in verschiedenen Organen

Die Transkriptmengen der drei WHIRLY-Gene wurden in verschiedenen Organen des Wildtyps von *A. thaliana* untersucht. Hierfür wurden Pflanzen auf Erde kultiviert (2.2.1), bis sie nach sieben Wochen eine Sprossachse mit Infloreszenzen bildeten. Von diesen Pflanzen wurden getrennt Rosettenblätter, Spross, Hochblätter, geschlossene Blütenknospen, geöffnete Blüten und grüne Schoten geerntet (Abb. E17A). Aus diesen sechs verschiedenen Organen wurde RNA isoliert (2.4.12.1), welche nach der Synthese von cDNA (2.4.10.1) für eine quantitative *Real-Time* PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für die Gene WHIRLY1, WHIRLY2 und WHIRLY3 eingesetzt wurde (2.4.10.2).

Bei allen drei WHIRLY-Genen betrug die Transkriptmenge im Spross nur etwa 5 % der Transkriptmenge in den Rosettenblättern (Abb. E17B). Die Transkriptmenge von WHIRLY1 betrug in Hochblättern 50 % der Transkriptmenge in Rosettenblättern, und die Transkriptmengen von WHIRLY2 und WHIRLY3 waren hier auf etwa 20 % reduziert. In geschlossenen Blütenknospen war für die beiden Gene, die für die plastidären WHIRLY-Proteine kodieren, eine erhöhte Transkriptmenge nachweisbar. So zeigte das WHIRLY3-Gen in Knospen eine fast achtfach erhöhte Transkriptmenge und das WHIRLY1-Gen sogar eine etwa 46-fach erhöhte Transkriptmenge im Vergleich zu den Rosettenblättern (Abb. E17B). Das WHIRLY2-Transkript war ähnlich wie im Spross und den Hochblättern auch in geschlossenen Blütenknospen nur schwach nachweisbar. Die Transkriptmenge in den Blütenknospen betrug 10 % der Transkriptmenge in Rosettenblättern. In reifen Blüten lagen die Transkriptmengen von WHIRLY1, WHIRLY2 und WHIRLY3 bei 10-30 % der Transkriptmenge

in den Rosettenblättern. Grüne Schoten enthielten im Vergleich zu den Rosettenblättern nur etwa 50 % der *WHIRLY3*-Transkriptmenge und sogar nur 3 % der *WHIRLY2*-Transkriptmenge. Nur für *WHIRLY1* waren die Transkriptmengen in grünen Schoten gleich denen in Rosettenblättern (Abb. E17B).

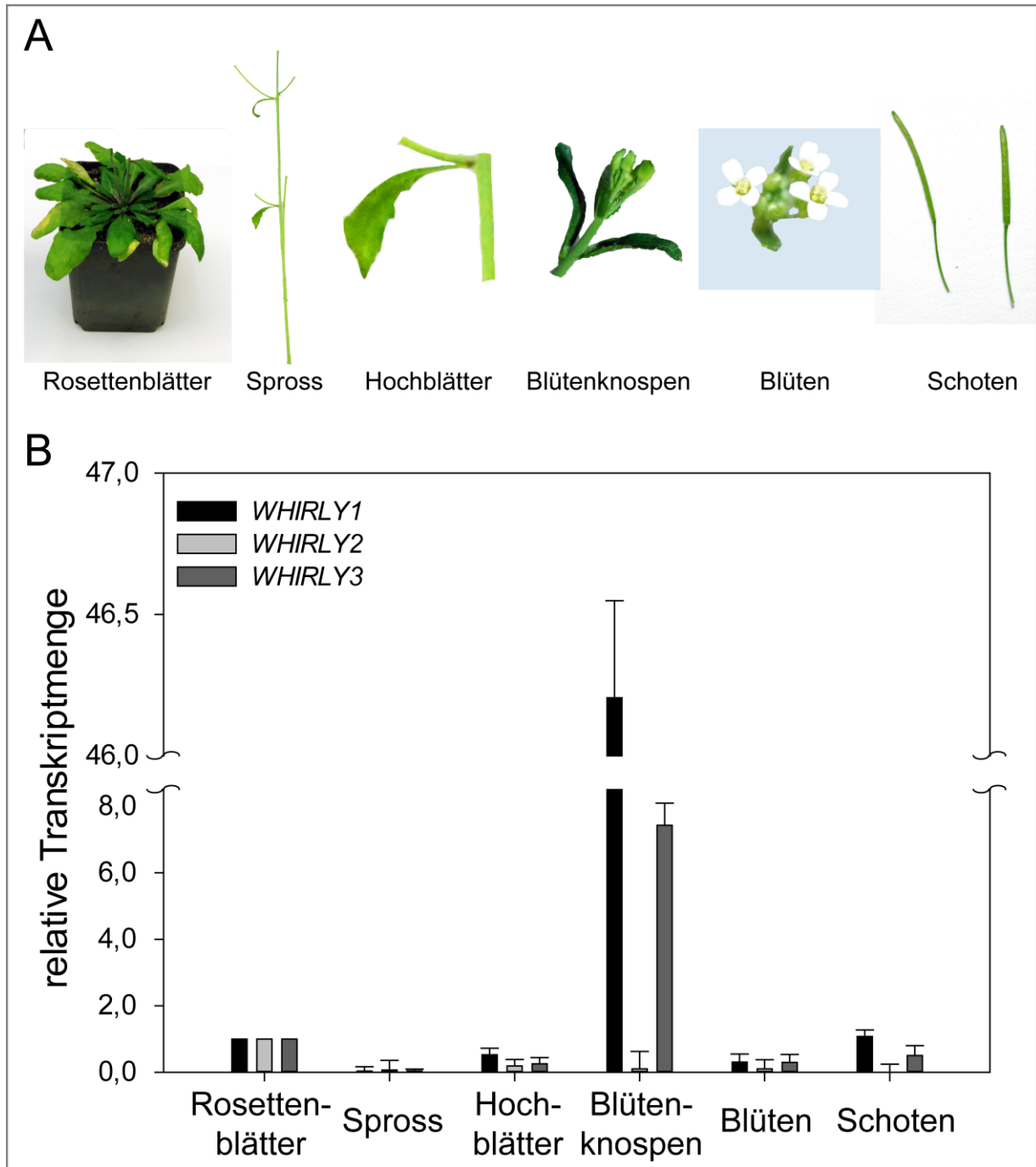


Abb. E17: Analyse der Transkriptmengen der *WHIRLY*-Gene in verschiedenen Organen des Wildtyps von *A. thaliana*. **A** RNA wurde aus verschiedenen Organen von sieben Wochen alten Pflanzen isoliert. **B** Die relativen Transkriptmengen der Gene *WHIRLY1*, *WHIRLY2* und *WHIRLY3* wurden mittels quantitativer *Real-Time* PCR ermittelt. Als Kontrollgen wurde *ACTIN2* genutzt. Die Transkriptmengen in Rosettenblättern sind auf den Wert 1 normiert, auf den sich alle weiteren Werte beziehen. Standardabweichungen wurden aus drei technischen Replikaten berechnet.

### 3.3.1.2 Transkriptmengen in Blättern verschiedener Entwicklungsstadien

Abgesehen von einer erhöhten Transkriptmenge von *WHIRLY1* und *WHIRLY3* in geschlossenen Blütenknospen waren die Transkriptmengen der drei *WHIRLY*-Gene von *A. thaliana* in Rosettenblättern am höchsten (3.3.1.1). Um festzustellen, ob die Transkriptmengen der *WHIRLY*-Gene sich während der Blattentwicklung ändern, erfolgte eine Untersuchung der RNA aus Blättern verschiedener Entwicklungsstadien.

Zunächst wurden die Transkriptmengen der *WHIRLY*-Gene in frühen und späten Keimlingsstadien verglichen. Samen des Wildtyps von *A. thaliana* wurden für vier bzw. zwölf Tage auf MS-Medium angezogen (2.2.2). Nach vier Tagen waren lediglich die Kotyledonen ausgebildet, und nach zwölf Tagen besaßen die Keimlinge bereits vier bis sechs Blätter (Abb. E18A). RNA aus Keimlingen der beiden Stadien wurde für eine quantitative *Real-Time* PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für die Gene *WHIRLY1*, *WHIRLY2* und *WHIRLY3* eingesetzt.

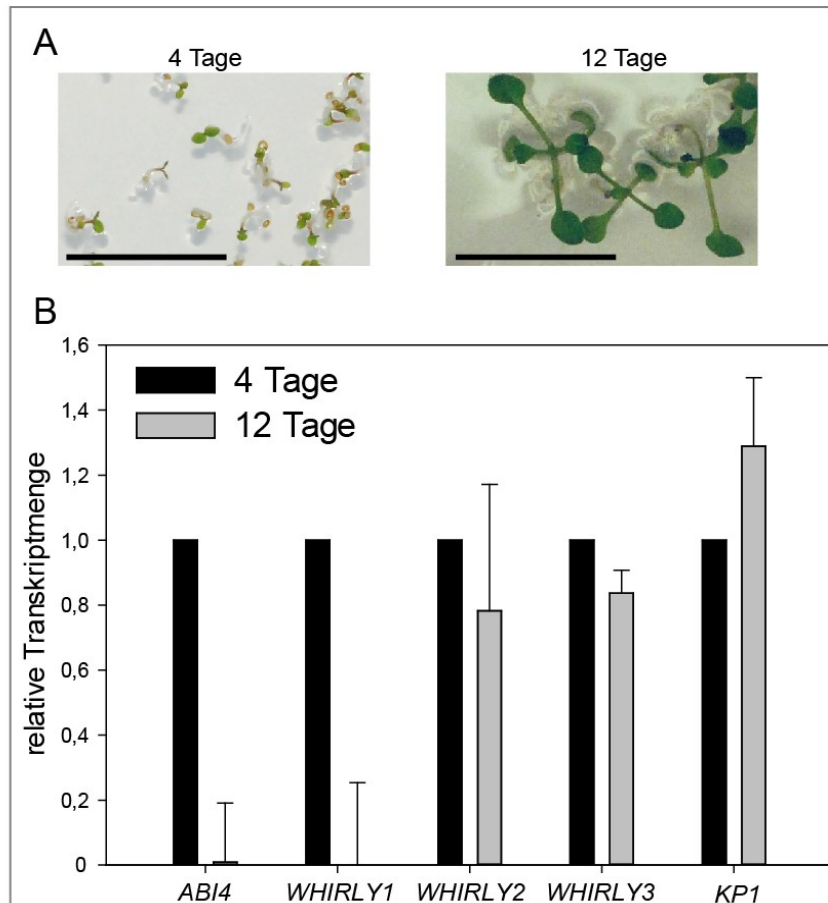


Abb. E18: Transkriptmengen der Gene *WHIRLY1*, *WHIRLY2*, *WHIRLY3*, *ABI4* und *KP1* in vier und zwölf Tage alten Keimlingen. **A** Keimlinge des Wildtyps von *A. thaliana*. Messbalken = 1 cm **B** RNA aus den in A dargestellten Keimlingen wurde für eine quantitative *Real-Time* PCR verwendet. Als Kontrollgen wurde *ACTIN2* genutzt. Die Transkriptmenge des jeweiligen Gens in den vier Tage alten Keimlingen ist auf den Wert 1 normiert, auf den sich der Wert in zwölf Tage alten Keimlingen bezieht. Standardabweichungen wurden aus drei technischen Replikaten berechnet.

Die Expression des *KP1*-Gens wird von *WHIRLY1* und *WHIRLY3* reguliert (Xiong et al., 2009). Um eine mögliche Koregulation der Expression von *WHIRLY1* und *WHIRLY3* mit der Expression des *KP1*-Gens aufzuzeigen, wurde zusätzlich die *KP1*-Transkriptmenge ermittelt. Die Transkriptmenge des Gens *ABI4* ist in sehr frühen Stadien der Keimung von *A. thaliana* hoch, fällt in der weiteren Entwicklung allerdings stark ab (Shkolnik-Inbar und Bar-Zvi, 2011). *ABI4* diene daher als Kontrollgen für die Entwicklung. Die Transkriptmengen des Gens *ABI4* und des *WHIRLY1*-Gens betrugen in zwölf Tage alten Keimlingen weniger als 1 % der Transkriptmengen in vier Tage alten Keimlingen (Abb. E18B). Die Transkriptmengen der Gene *WHIRLY2*, *WHIRLY3* und *KP1* veränderten sich mit zunehmendem Alter hingegen kaum. Es wird somit nicht angenommen, dass die Expression der Gene *WHIRLY1* und *KP1* während der frühen Entwicklung koreguliert ist.

Bei der lichtabhängigen Umwandlung von Etioplasten zu Chloroplasten verändert sich die Transkriptionsrate von fast 30 % der kernkodierten Gene. Hiervon ist vermehrt die Expression solcher Gene betroffen, die für Plastidenproteine kodieren (Pogson und Albrecht, 2011). Entsprechende RT-PCR Studien an etiolierten Keimlingen von *A. thaliana* zeigten jedoch, dass sich weder die Transkriptmenge der Gene *WHIRLY1* und *WHIRLY3* noch die des *WHIRLY2*-Gens während der Ergrünung ändert (Anhang Abb. A9). Dies bestätigt Ergebnisse zur Transkriptmenge der *WHIRLY*-Gene während der Ergrünung der Gerste (Grabowski, 2008).

Um die Transkriptmengen der *WHIRLY*-Gene in späteren Phasen der Blattentwicklung zu untersuchen, wurden Pflanzen des Wildtyps auf Erde bis zur Seneszenz angezogen. In der neunten Woche zeigten die Rosettenblätter eine Gelbfärbung im Randbereich. Nach zwölf Wochen waren die Blätter bereits deutlich vergilbt und teilweise abgestorben (Abb. E19B). Als Parameter für das Fortschreiten der Seneszenz, wurde Fv/Fm bestimmt (2.3). Bei den hier untersuchten Pflanzen war nach drei Wochen ein Wert von 0,8 erreicht, der sich bis zur achten Woche kaum veränderte (Abb. E19B). Ab der neunten Woche sank der Fv/Fm Wert kontinuierlich und lag in der zwölften Woche bei unter 0,78.

### 3. Ergebnisse

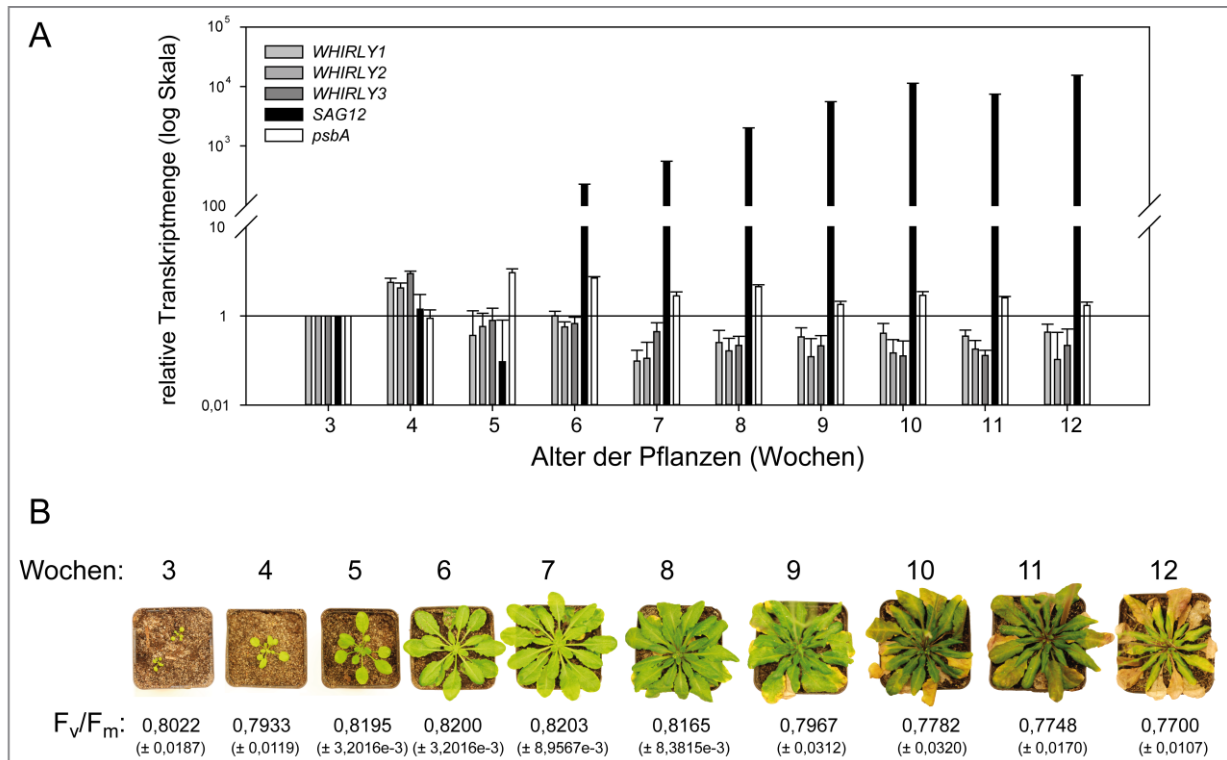


Abb. E19: Relative Transkriptmengen in Rosettenblättern von drei bis zwölf Wochen alten Pflanzen des Wildtyps von *A. thaliana*. **A** Die drei *WHIRLY*-Gene sowie die Gene *SAG12* und *psbA* wurden mittels quantitativer *Real-Time* PCR untersucht. Als Kontrollgen wurde *ACTIN2* genutzt. Die Transkriptmenge des jeweiligen Gens in den drei Wochen alten Pflanzen ist auf den Wert 1 normiert, auf den sich alle anderen Werte beziehen. Standardabweichungen wurden aus drei technischen Replikaten berechnet. **B** Unter den drei bis zwölf Wochen alten Pflanzen ist die photochemische Effizienz des Photosystems II ( $F_v/F_m$ ) der Rosettenblätter dargestellt. Für jede Woche sind die Mittelwerte aus Messungen von jeweils fünf Pflanzen gezeigt.

Von den so charakterisierten Pflanzen wurden drei bis zwölf Wochen nach Aussaat Rosettenblätter zur Analyse der Transkriptmengen der drei *WHIRLY*-Gene mittels quantitativer *Real-Time* PCR geerntet. Die Transkriptmengen der Gene *SAG12* und *psbA* wurden als Marker für die Entwicklung verwendet. Die Expression des Gens *SAG12* steigt in seneszenten Blättern stark an. Die Expression des *psbA*-Gens, welches für das D1-Protein des PSII kodiert, wird abhängig von der Blattentwicklung reguliert.

Die relative Transkriptmenge des Seneszenzmarkergens *SAG12* stieg ab der sechsten Woche stark an, wohingegen die relative Transkriptmenge des Gens *psbA* zunächst von Woche drei bis Woche sechs anstieg, dann aber wieder leicht sank (Abb. E19A). Die untersuchten Pflanzen entwickelten sich somit von der dritten bis zur sechsten Woche noch und gingen ab der achten Woche in die Seneszenz über. In der vierten Woche wurde im Vergleich zur dritten Woche für alle drei *WHIRLY*-Gene ein Anstieg der Transkriptmenge auf etwa 250 % festgestellt (Abb. E19A). In der fünften und sechsten Woche war die Transkriptmenge aller drei *WHIRLY*-Gene

ähnlich hoch wie in Woche drei. Ab der siebten Woche der Anzucht betrugen die Transkriptmengen aller drei *WHIRLY*-Gene etwa 50 % der Transkriptmengen in der dritten Woche (Abb. E19A). Die relativen Transkriptmengen der drei *WHIRLY*-Gene zeigten somit keine deutlichen seneszenzabhängigen Veränderungen.

#### 3.3.2 Untersuchungen an Mutanten und Überexpressionslinien

##### 3.3.2.1 Molekulare Charakterisierung der *WHIRLY1*-T-DNA-Insertionsmutanten

Um weitere Hinweise auf Funktionen der *WHIRLY*-Proteine zu erhalten, wurden phänotypische Untersuchungen an Mutanten durchgeführt. Für das Gen *WHIRLY1* von *A. thaliana* sind insgesamt fünf T-DNA-Insertionsmutanten erhältlich (NASC). Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden die Mutanten Salk\_023713 und Salk\_147680 ausgewählt. Diese werden im Folgenden als *why1-1* und *why1-2* bezeichnet (1.4.3.3, 2.2.1). In der genomischen DNA der Mutante *why1-1* liegt die Insertionsstelle der T-DNA vier Basenpaare hinter dem Translationsstart, in der *why1-2*-Mutante liegt die T-DNA 24 Basenpaare weiter *downstream* (Abb. E20A).

Zur Prüfung der Homozygotie der beiden Linien wurde eine PCR mit genomischer DNA und den Oligonukleotiden LP, RP und LBa1 (Abb. E20A) so durchgeführt wie vom *T-DNA Express Tool* des Salk Instituts empfohlen (2.4.9). Das LP-RP DNA-Fragment des Wildtyp-Allels war in den Mutanten nicht nachweisbar (Abb. E20B). Das kleinere durch die T-DNA-Insertion entstandene DNA-Fragment war jedoch in beiden Linien detektierbar (Abb. E20B). Folglich wurde davon ausgegangen, dass beide Mutanten für die T-DNA-Insertion homozygot waren.

Um zu prüfen, ob die komplette *WHIRLY1*-mRNA in den Linien *why1-1* und *why1-2* transkribiert wird, wurden die Oligonukleotide „fwd“ und „rvs“, welche das AUG Startcodon, Exon1 und Teile von Exon2 flankieren (Abb. E20A), in einer RT-PCR (2.4.9) verwendet. Hierfür wurde RNA aus den beiden Mutanten und dem Wildtyp eingesetzt. Das etwa 300 bp große DNA-Fragment, welches dem Bereich zwischen den Bindestellen der Oligonukleotide „fwd“ und „rvs“ entspricht, wurde nur im Wildtyp und nicht in den Mutanten detektiert (Abb. E20C). Die mRNA für *ACTIN2*, welche als Beladungskontrolle genutzt wurde, war dagegen in allen drei Genotypen nachweisbar. In den Mutanten *why1-1* und *why1-2* wird somit die *WHIRLY1*-mRNA nicht synthetisiert.



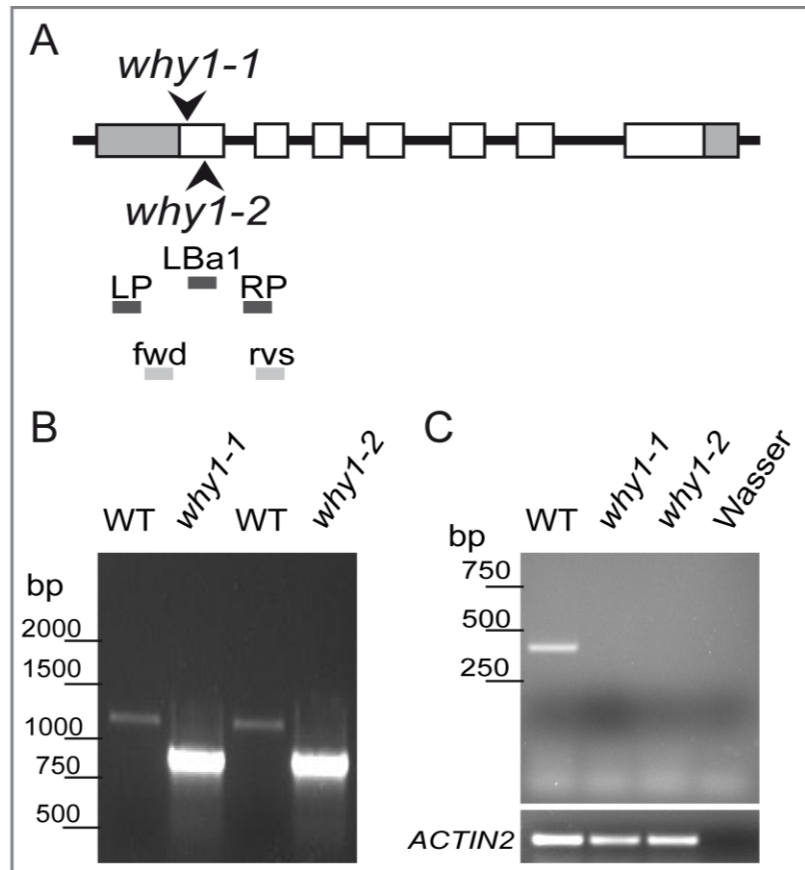


Abb. E20: Charakterisierung der Mutanten *why1-1* und *why1-2*. **A** Schematische Darstellung der beiden Insertionsstellen der T-DNA im *WHIRLY1*-Gen. Exone des *WHIRLY1*-Gens sind durch dickere, Introne durch dünnere Balken dargestellt. Graue Bereiche zeigen die 3' bzw. 5' nicht-kodierenden Bereiche an. Die Positionen der T-DNA-Insertionen sind mit Pfeilköpfen markiert. Zusätzlich sind die Bindestellen der Oligonukleotide gezeigt, die für den Homozygotietest (LP, LBa1, RP) bzw. zur Prüfung auf das Vorhandensein des Startcodons ATG in der mRNA (fwd, rvs) genutzt wurden. **B** Für einen Homozygotietest kam genomische DNA des Wildtyp (WT) und der *why1-1*- bzw. *why1-2*-Mutante mit den in A gezeigten Oligonukleotiden zum Einsatz. **C** Es wurde eine RT-PCR mit cDNA aus den beiden Mutanten und dem Wildtyp (WT) und den in A gezeigten Oligonukleotiden durchgeführt. Als Beladungskontrolle dienten amplifizierte *ACTIN2*-DNA-Fragmente und zur weiteren Kontrolle wurde eine PCR mit Wasser anstelle von cDNA durchgeführt.

### 3.3.2.2 Molekulare Charakterisierung von *WHIRLY1*-Überexpressionslinien

Als dual lokalisiertes Protein kann *WHIRLY1* verschiedene Aufgaben in den beiden Kompartimenten übernehmen (1.4.3). Um zwischen Funktionen von *WHIRLY1* in den Plastiden und Funktionen von *WHIRLY1* im Zellkern unterscheiden zu können, wurden von N. Grabe drei transgene Linien erstellt, die verschiedene *WHIRLY1*-Konstrukte in Fusion mit der Sequenz für das HA-Tag überexprimieren. Die Konstrukte stehen im genetischen Hintergrund der *why1-1*-Mutante unter Kontrolle des 35S-Promotors (2.2.1; Grabe, 2007; Isemer et al., 2012b). In Pflanzen, die die komplette *WHIRLY1*-Sequenz in Fusion mit der Sequenz für das HA-Tag überexprimieren (pn*WHIRLY1*:HA), ist das rekombinante Protein sowohl in Zellkernen als auch in Plastiden zu erwarten (Abb. E21A). Für ein kürzeres Protein ohne die plastidäre Importsequenz wurde hingegen eine alleinige Akkumulation im Zellkern erwartet (n*WHIRLY1*:HA). In Pflanzen, die eine komplette *WHIRLY1*-Sequenz mit einer zusätzlich eingefügten Kernexportsequenz überexprimieren (p*WHIRLY1*:HA), sollte *WHIRLY1* nur in den Plastiden akkumulieren (Abb. E21A).

Um die subzelluläre Verteilung der rekombinanten *WHIRLY1*-Proteine in den drei Überexpressionslinien zu untersuchen, wurden zunächst Plastiden (2.5.2.1) und Zellkerne (2.5.4) aus den Linien pn*WHIRLY1*:HA, n*WHIRLY1*:HA und p*WHIRLY1*:HA sowie dem Wildtyp isoliert und Proteinextrakte aus diesen Zellfraktionen immunologisch auf das Vorhandensein des jeweiligen rekombinanten *WHIRLY1*:HA-Proteins hin untersucht. In Pflanzen, die das komplette *WHIRLY1*:HA-Konstrukt überexprimierten (pn*WHIRLY1*:HA), war das HA-Tag in beiden Kompartimenten detektierbar (Abb. E21B). Das rekombinante Protein, welches aus dem Konstrukt ohne die Sequenz für die plastidäre Importsequenz entsteht, war hingegen nur in der Zellkernfraktion nachweisbar (n*WHIRLY1*:HA). Wider Erwarten wurde in der transgenen Linie p*WHIRLY1*:HA das rekombinante *WHIRLY1*-Protein nicht ausschließlich in den Plastiden, sondern auch in der Zellkernfraktion detektiert (Abb. E21B). Diese Linie war somit für Untersuchungen zur Funktion in den Plastiden ungeeignet. Um die Reinheit der Fraktionen zu zeigen, wurden vergleichbare Membranen mit Antikörpern gegen die Proteine Cytochrom *b<sub>559</sub>*, ein spezifisches Markerprotein der Chloroplasten, und die RNA Polymerase I, ein spezifisches Markerprotein des Zellkerns, immunodekoriert. Diese Analysen zeigten, dass die Chloroplastenfraktion keine detektierbaren Mengen an Kernproteinen enthielt und umgekehrt die Kernfraktion keine detektierbaren Mengen an Plastidenproteinen (Abb. E21B).

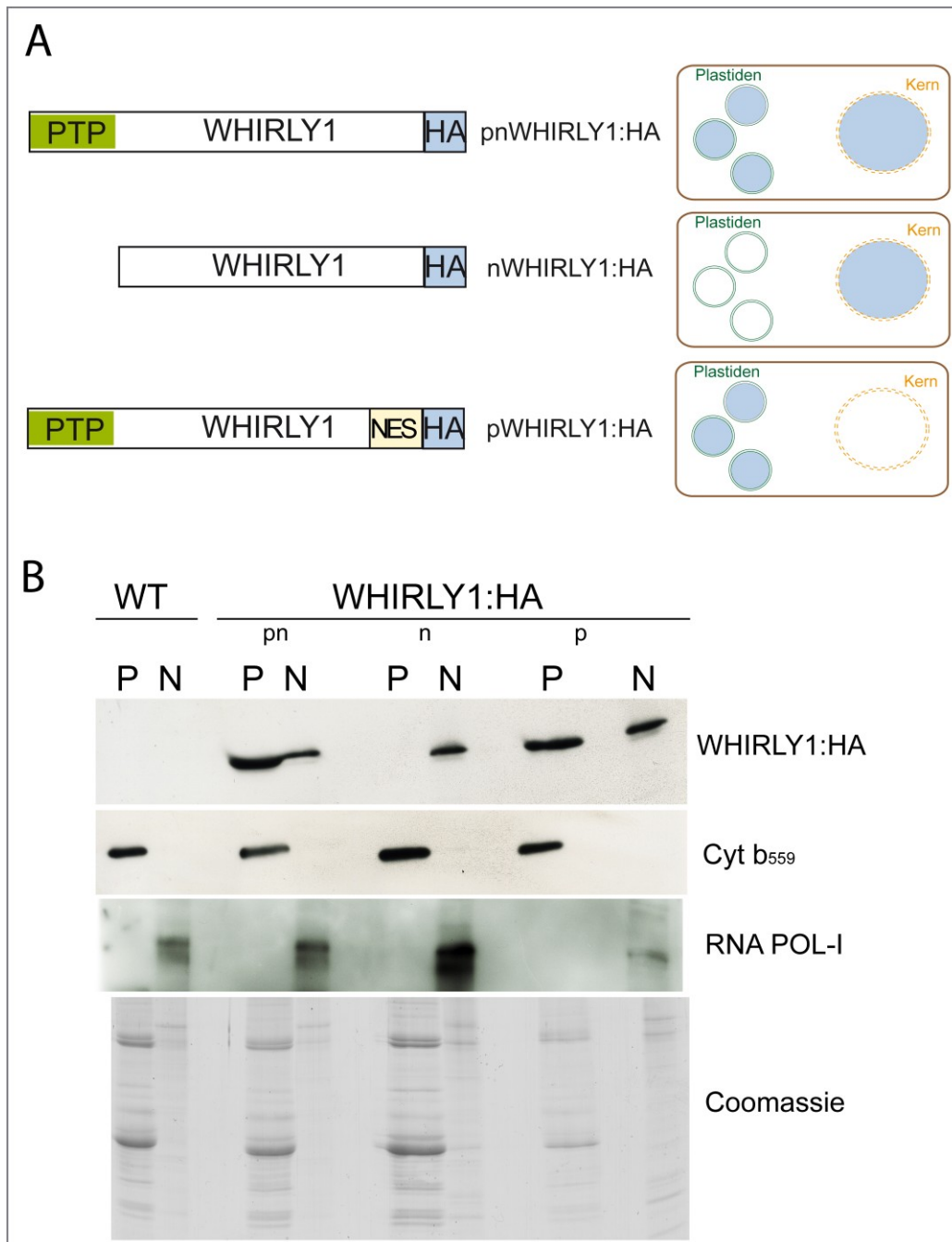


Abb. E21: Charakterisierung von transgenen Linien, die entweder die komplette *WHIRLY1*-Sequenz in Fusion mit einem HA-Tag (pnWHIRLY1:HA) oder eine gekürzte *WHIRLY1*-Sequenz ohne die plastidäre Importsequenz (nWHIRLY1:HA) oder die *WHIRLY1*-Sequenz in Fusion mit einer Kernexportsequenz (pWHIRLY1:HA) überexprimieren. **A** Schematische Darstellung der Konstrukte, die für die Transformation von *why1-1* Pflanzen Verwendung fanden. Das rechte Schema zeigt die theoretisch erwartete Verteilung der rekombinanten WHIRLY1-Proteine. PTP: plastidäre Importsequenz; NES: Kernexportsequenz; HA: Hämagglutinin-Tag **B** Proteinextrakte aus Plastiden- (P) und Kernfraktionen (N) der transgenen Linien pnWHIRLY1:HA, nWHIRLY1:HA und pWHIRLY1:HA sowie des Wildtyps (WT) kamen für einen Immunnachweis mittels Western Blot zum Einsatz. Es wurden Antikörper gegen das HA-Tag des rekombinanten WHIRLY1-Proteins (WHIRLY1:HA), Cytochrom b<sub>559</sub> (Cyt b<sub>559</sub>) und die RNA-Polymerase I (RNA POL-I) verwendet. Als Beladungskontrolle wurde ein vergleichbares Gel mit Coomassie-Brillantblau gefärbt.

### 3.3.2.3 Phänotyp der Mutanten und *WHIRLY1*-Überexpressionslinien

Bei einer Anzucht unter Standardbedingungen (2.2.1) war der Phänotyp der T-DNA-Insertionsmutanten *why1-1* und *why1-2* (3.3.2.1) nicht von dem des Wildtyps zu unterscheiden. Diese Beobachtung wurde sowohl an voll entwickelten Pflanzen als auch an Keimlingen gemacht. Die Keimlinge wurden während der ersten fünf Tage nach Aussaat auf MS-Medium (2.2.2) beobachtet (Abb. E22). Diese Ergebnisse stimmen mit denen vorangegangener Arbeiten zu den Mutanten *why1-1* und *why1-2* überein (Yoo et al., 2007).

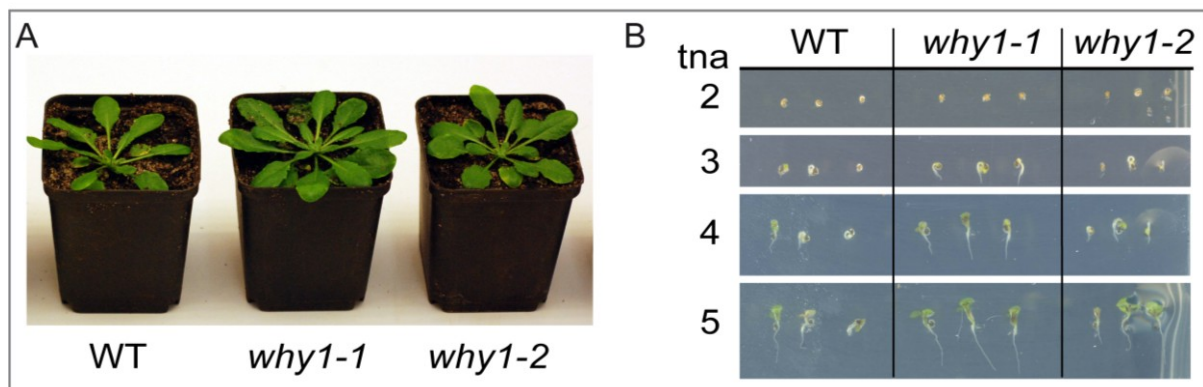


Abb. E22: Phänotyp der Mutanten *why1-1* und *why1-2* im Vergleich mit dem Wildtyp (WT). **A** Sechs Wochen alte Pflanzen. **B** Keimlinge zwei bis fünf Tage nach Aussaat (tna).

Für das *WHIRLY3*-Gen sind keine geeigneten T-DNA-Insertionslinien erhältlich, jedoch wurde eine TILLING-Mutante (*targeting induced local lesions in genomes*) identifiziert. In dieser ist das 138. Basentriplet des *WHIRLY3*-Gens von TGG zu TGA mutiert, wodurch ein Stoppcodon entsteht (Maréchal et al., 2009). Zusätzlich wurde eine Mutante (Salk\_099937, als *why1-p* bezeichnet), welche eine T-DNA-Insertion im Promotorbereich von *WHIRLY1* (102 Basenpaare vor dem Startcodon ATG) besitzt, charakterisiert und mit der *WHIRLY3*-TILLING-Mutante gekreuzt (Maréchal et al., 2009; 1.4.3.3). Die *WHIRLY3*-TILLING-Mutante (ab jetzt als *til-why3* bezeichnet) und die *WHIRLY1/WHIRLY3*-Doppelmutante (ab jetzt als *why1-p x til-why3* bezeichnet) wurden für die Phänotypanalysen genutzt.

Um den Phänotyp der Mutanten *til-why3* und *why1-p x til-why3* mit dem des Wildtyps und der *why1-1*-Mutante zu vergleichen, wurden Pflanzen für zwölf Wochen unter Standardbedingungen angezogen (2.2.1). Sowohl die *til-why3*-Mutante als auch die Doppelmutante *why1-p x til-why3* zeigten eine verzögerte Entwicklung im Vergleich zum Wildtyp und zur *why1-1*-Mutante (Abb. E23A, B). Dies zeigte sich besonders auffällig durch eine spätere Blütenentwicklung bei den *til-why3*- und *why1-p x til-why3*-Mutanten (Abb. E23B).

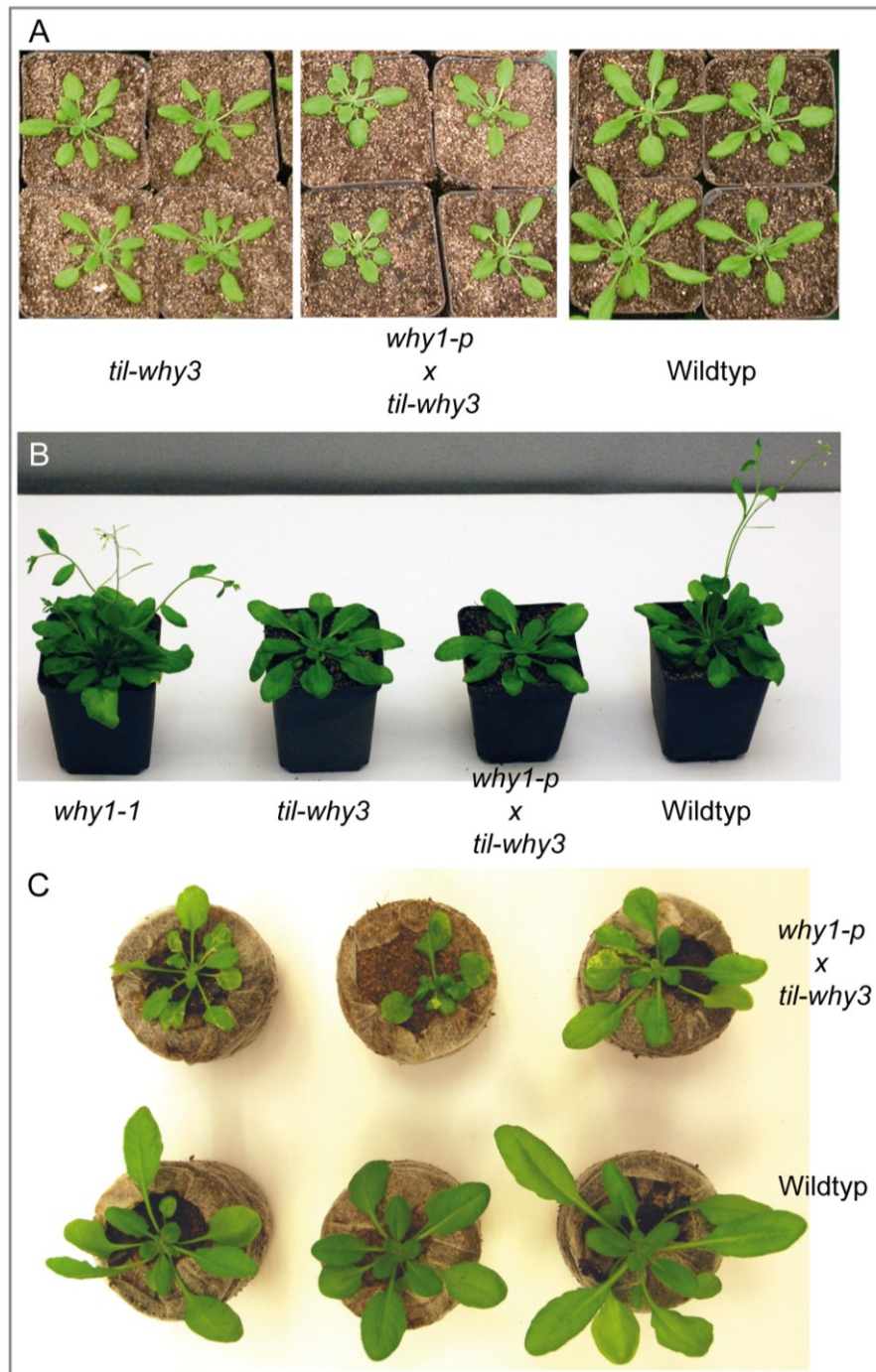


Abb. E23: Phänotyp der Mutanten *why1-1*, *til-why3* und *why1-p x til-why3* im Vergleich zum Wildtyp. Fünf Wochen (A) und sieben Wochen (B) alte Pflanzen, die unter Standardbedingungen ( $80\text{--}100 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ) angezogen wurden. C Vier Wochen alte Pflanzen der Doppelmutante *why1-p x til-why3* sowie des Wildtyps, die bei einer Lichtintensität von  $180 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{ m}^{-2}$  angezogen wurden. 6,2 % der untersuchten *why1-p x til-why3*-Mutanten hatten variierte Blätter ( $n = 210$ ).

In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe Brisson zur Mutante *why1-p x til-why3* wiesen 4 % der untersuchten Pflanzen zumindest ein variiertes, d.h. teilweise weiß gefärbtes Blatt auf (Maréchal et al., 2009). Im Rahmen der eigenen Arbeiten entwickelten Pflanzen der Linie *why1-p x til-why3* unter Standardanzuchtbedingun-



gen ( $80\text{--}100 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ) jedoch keine variierten Blätter. Erfolgte die Anzucht stattdessen bei einer höheren Lichtintensität ( $180 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ) und ansonsten gleichen Bedingungen, wurden einzelne Pflanzen mit variierten, teilweise deformierten Blättern beobachtet (Abb. E23C). Es hatten 6,2 % der Pflanzen mindestens ein variiertes Blatt ( $n = 210$ ). Pflanzen des Wildtyps, die unter gleichen Bedingungen angezogen wurden, zeigten keine Veränderungen ihrer Blätter.

Bei Anzucht der Überexpressionslinien pnWHIRLY1:HA und nWHIRLY1:HA (3.3.2.4) zeigte sich kein auffälliger Phänotyp. Die Pflanzen wurden sowohl über zwölf Wochen auf Erde kultiviert und wöchentlich fotografiert, als auch in den ersten fünf Tagen nach Aussaat auf MS-Medium beobachtet (Abb. E24).

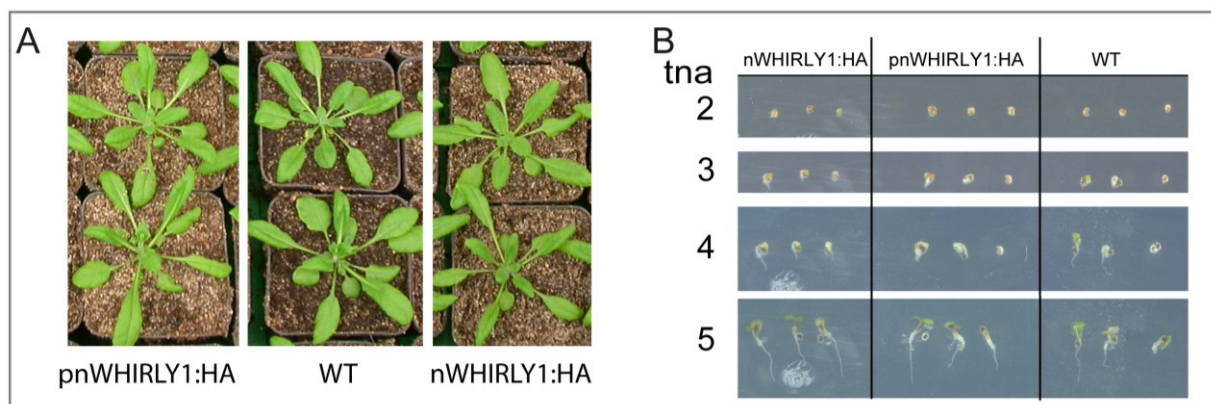


Abb. E24: Phänotyp von Pflanzen der transgenen Linien, die entweder die komplette *WHIRLY1*-Sequenz in Fusion mit einem HA-Tag (pnWHIRLY1:HA) oder eine gekürzte Sequenz ohne die plastidäre Importsequenz (nWHIRLY1:HA) überexprimierten, im Vergleich zum Wildtyp. **A** Fünf Wochen alte Pflanzen. **B** Keimlinge zwei bis fünf Tage nach Aussaat (tna).

### 3.3.3 Bedeutung der WHIRLY-Proteine für den Einfluss von Phytohormonen auf die Keimung von *Arabidopsis thaliana*

#### 3.3.3.1 Einfluss von Salicylsäure und Abscisinsäure auf die Keimung von *why1*-Mutanten

Das WHIRLY1-Protein wurde bereits in früheren Studien mit dem Phytohormon Salicylsäure (SA) in Verbindung gebracht (Desveaux et al., 2000, 2004, 2005; Xiong et al., 2009). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die biologischen Effekte von SA durch WHIRLY1 vermittelt werden. SA hat vielfältige Effekte während der Pflanzenentwicklung. Unter anderem inhibiert es die Keimung von *A. thaliana* (Rajjou et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wird am Beispiel der Keimung untersucht, ob WHIRLY1 am SA-Signalweg beteiligt ist.

Die Empfindlichkeit von Samen der Mutanten *why1-1* und *why1-2* (3.3.2.1) gegenüber SA wurde in einem Keimungsexperiment mit der Empfindlichkeit des Wildtyps

verglichen. Hierfür wurden Samen auf MS-Medium unter Zugabe von 0,2 bis 1 mM SA gekeimt (2.2.2). Bei Konzentrationen von 0,2 bis 0,5 mM SA war die Keimungsrate der Mutanten 10-20 % höher als im Wildtyp (Abb. E25A). Am deutlichsten waren die Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp bei einer Konzentration von 1 mM SA. Während bei dieser Konzentration weniger als 5 % der Samen des Wildtyps keimten, keimten *why1-1* und *why1-2* noch zu etwa 35 % (Abb. E25A).

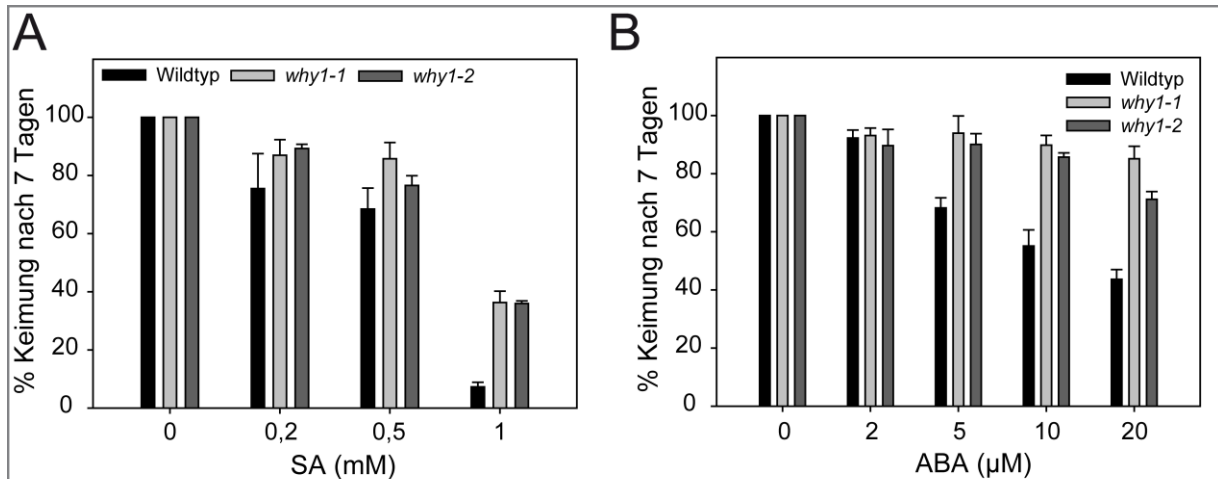


Abb. E25: Hemmung der Keimung durch Salicylsäure (SA) bzw. Abscisinsäure (ABA). Samen der Mutanten *why1-1* und *why1-2* sowie des Wildtyps wurden auf agarhaltigem Medium mit 0,2 bis 1 mM SA (**A**) bzw. mit 2 bis 20 μM ABA (**B**) angezogen. Der prozentuale Anteil an Samen mit sichtbarer Keimwurzel wurde nach siebentägiger Anzucht ermittelt. Dargestellte Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SE aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 20 bis 50 Samen. Die Prozentwerte in den Kontrollexperimenten ohne Zugabe eines Phytohormons wurden auf 100 % festgesetzt.

Befunde aus vorangegangenen Arbeiten deuteten darauf hin, dass in *A. thaliana* eine Behandlung von Samen mit SA zu einem Anstieg der Abscisinsäuremenge führt (Rajjou et al., 2006). Abscisinsäure (ABA) inhibiert die Keimung (Finkelstein und Somerville, 1990; Cutler et al., 2010). Der inhibierende Effekt von SA auf die Keimung von *A. thaliana* wurde folglich der Wirkung von ABA zugeschrieben (Rajjou et al., 2006). Somit ist es möglich, dass die geringe Empfindlichkeit der Mutanten gegenüber SA während der Keimung eigentlich durch eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber ABA verursacht wurde.

Um die Sensitivität von *why1*-Mutanten gegenüber ABA zu testen, wurden Keimungsexperimente bei ABA-Konzentrationen von 2 bis 20 μM mit den Mutanten *why1-1* und *why1-2* sowie dem Wildtyp durchgeführt (2.2.2). Beide Mutanten zeigten eine deutlich höhere Unempfindlichkeit gegenüber ABA verglichen mit dem Wildtyp. Nach Zugabe von 10 μM ABA sank die Keimungsrate des Wildtyps auf 40 %, während die Keimungsrate der *why1*-Mutanten hier bei etwa 80 % lag (Abb. E25B). Die *why1*-Mutanten gehören somit zu den *abi*-Mutanten (*abscisic acid insensitive*), die auf Grund ihrer Unempfindlichkeit gegenüber ABA während der Keimung entdeckt wurden (Finkelstein et al., 1998).

### 3.3.3.2 Einfluss von Abamin auf die Hemmung der Keimung durch Salicylsäure

Um zu testen, ob die Hemmung der Keimung durch SA tatsächlich durch einen Anstieg der Menge an ABA hervorgerufen wird (3.3.3.1), wurde die ABA-Biosynthese mit Abamin gehemmt. Abamin ist ein spezifischer Inhibitor des Enzyms NCED (9-Cis-Epoxycarotinoid Dioxygenase), durch den die Bildung des ABA-Vorläufermoleküls Xanthoxin verhindert wird (Han et al., 2004). Xanthoxin ist das letzte Intermediat des ABA-Biosyntheseweges, das in Plastiden produziert wird (Seo und Koshiba, 2011).

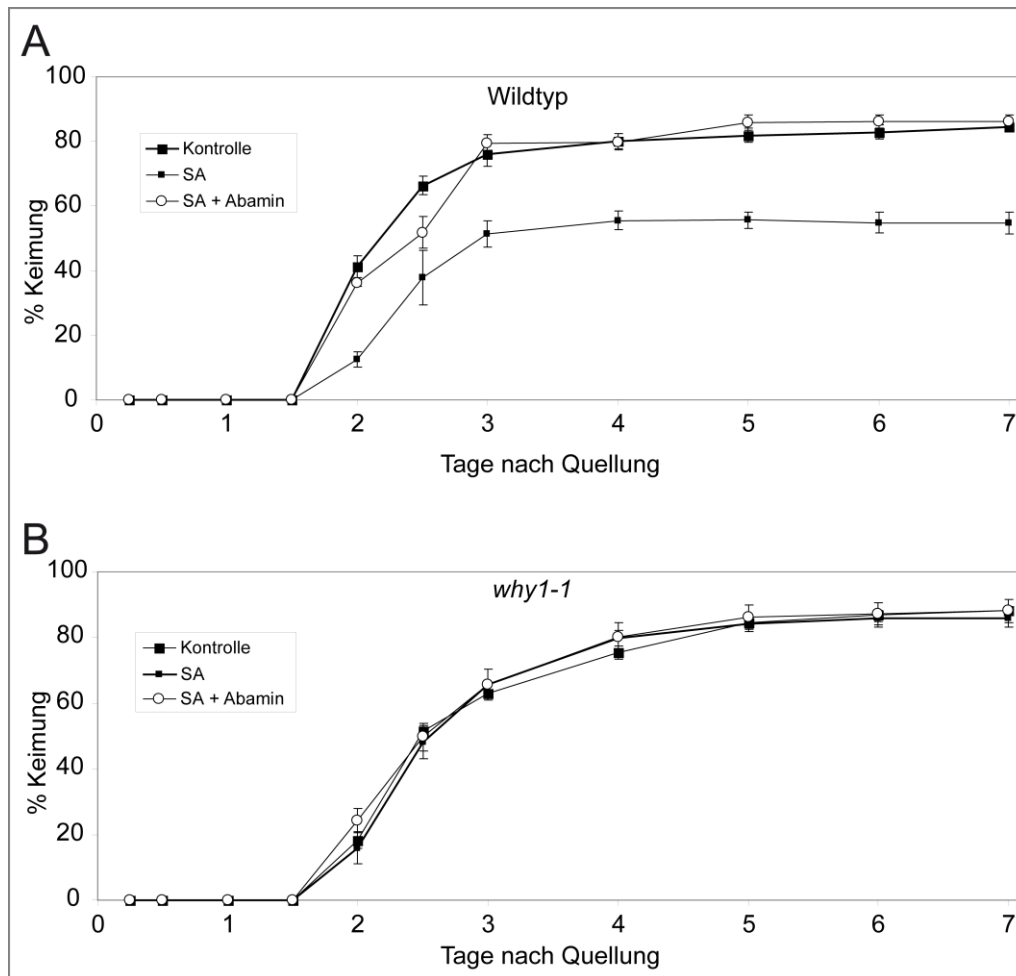


Abb. E26: Einfluss von Abamin auf die Hemmung der Keimung durch Salicylsäure (SA). Samen des Wildtyps (**A**) und der *why1-1*-Mutante (**B**) wurden auf agarhaltigem Medium ohne Zusatz (Kontrolle), mit 0,5 M SA oder 0,5 M SA + 50  $\mu$ M Abamin gekeimt. Der prozentuale Anteil an Samen mit sichtbarer Keimwurzel wurde während der ersten sieben Tage nach Quellung täglich ermittelt. Dargestellte Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SE aus fünf unabhängigen Experimenten mit jeweils 20 bis 50 Samen.

Während der ersten sieben Tage der Entwicklung wurde die Keimungsrate des Wildtyps auf SA-haltigem MS-Medium mit und ohne Zugabe von 50  $\mu$ M Abamin verglichen (2.2.2). Weniger als 20 % der auf 0,5 M SA ausgelegten Samen des Wildtyps keimten in den ersten zwei Tagen nach Quellung. Nach vier Tagen war eine Keimungsrate von 80 % erreicht, die sich auch in den darauf folgenden Tagen nicht veränderte (Abb. E26A).



Bei Anzucht auf SA-haltigem MS-Medium in Gegenwart von 50  $\mu$ M Abamin war die Keimung des Wildtyps hingegen genau so effizient wie in einem Kontrollexperiment ohne SA (Abb. E26A). Die Zugabe von SA scheint also die endogene Menge an ABA zu erhöhen, wodurch die Keimung gehemmt wird. Bei Durchführung eines vergleichbaren Experimentes mit der *why1-1*-Mutante konnten im Vergleich zum Kontrollansatz keine Unterschiede in der Keimungseffizienz der Ansätze, die nur SA oder SA mit Abamin enthielten, festgestellt werden (Abb. E26B). Dieses Ergebnis entspricht der Beobachtung, dass die *why1-1*-Mutante während der Keimung unempfindlich gegenüber SA ist (3.3.3.1).

#### 3.3.3.3 Einfluss von Abscisinsäure und Salicylsäure auf die Keimung von *gun*-Mutanten

Das dual lokalisierte Protein WHIRLY1, welches von Plastiden in den Zellkern umverteilt wird (3.1.3), könnte eine Rolle bei der Übertragung plastidärer retrograder Signale spielen (1.2). Einige *gun*-Mutanten (*genomes uncoupled*), welche auf Grund einer Störung in der retrograden Signalübertragung identifiziert wurden, sind wie *why1*-Mutanten auch insensitiv gegenüber ABA während der Keimung (Voigt et al., 2010).

Um zu untersuchen, ob *why1*-Mutanten mit *gun*-Mutanten hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber ABA während der Keimung vergleichbar sind, wurden ABA-Keimungsversuche auch mit den Mutanten *gun1-1*, *gun1-102* und *gun5* durchgeführt (2.2.2). Bei einer Konzentration von 20  $\mu$ M ABA, bei der weniger als 20 % der Samen des Wildtyps keimten, zeigten 60 % der *gun1-102* Samen und etwa 80 % der *gun1-1* und *gun5* Samen eine Keimung (Abb. E27A). Unter den hier verwendeten Bedingungen sind somit die *gun1*- und *gun5*-Mutanten hinsichtlich ihrer ABA-Sensitivität vergleichbar mit den *why1*-Mutanten.

Der Einsatz des ABA-Biosyntheseinhibitors Abamin zeigte, dass der inhibitorische Effekt von SA auf die Keimung nicht durch SA, sondern durch einen Anstieg der Menge an ABA ausgelöst wird (3.3.3.2). Somit sollten Mutanten, die unempfindlich gegenüber ABA sind, auch unempfindlich gegenüber SA sein. Um zu untersuchen, ob dies auch für die in dieser Arbeit verwendeten *gun*-Mutanten gilt, wurde die Keimung der Mutanten *gun1-1*, *gun1-102* und *gun5* auf SA untersucht. Während weniger als 70 % der Samen des Wildtyps bei einer Konzentration von 0,5 mM SA keimten, war bei der gleichen Konzentration die Keimung der *gun*-Mutanten um nur 20 % reduziert (Abb. E27B). Die Sensitivität der *gun*-Mutanten gegenüber SA ist somit vergleichbar mit der Sensitivität der *why1*-Mutanten.

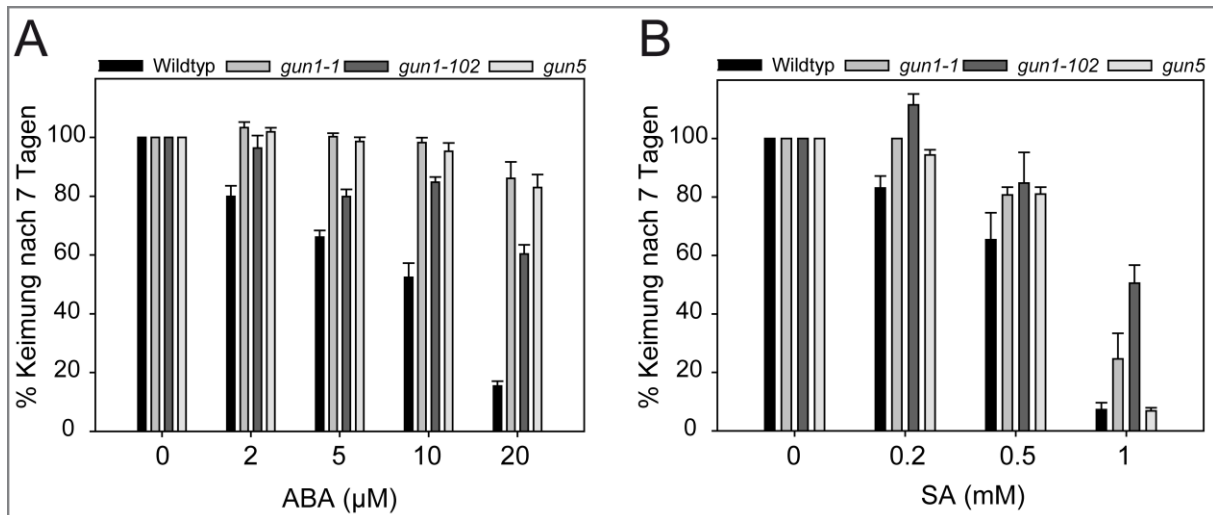


Abb. E27: Hemmung der Keimung durch Abscisinsäure (ABA) bzw. Salicylsäure (SA). Samen der Mutanten *gun1-1*, *gun1-102* und *gun5* sowie des Wildtyps wurden auf agarhaltigem Medium mit 2 bis 20  $\mu\text{M}$  ABA (**A**) bzw. mit 0,2 bis 1 mM SA (**B**) angezogen. Der prozentuale Anteil an Samen mit sichtbarer Keimwurzel wurde nach siebentägiger Anzucht ermittelt. Dargestellte Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SE aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 20 bis 50 Samen. Die gemittelten Prozentwerte in den Kontrollexperimenten ohne ABA bzw. SA wurden auf 100 % festgesetzt.

#### 3.3.3.4 Einfluss von Abscisinsäure auf die Keimung von *WHIRLY1*-Überexpressionslinien

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Keimungsversuche zeigten, dass *why1*-Mutanten während der Keimung gegenüber ABA weniger empfindlich als der Wildtyp sind (3.3.3.1). Das dual lokalisierte *WHIRLY1*-Protein könnte somit eine Funktion bei der Wahrnehmung von ABA in der Zelle haben. Um zu untersuchen, ob das in Plastiden lokalisierte *WHIRLY1* oder *WHIRLY1* im Zellkern oder aber beide Isoformen für die Wahrnehmung von ABA wichtig sind, wurden Keimungsversuche mit den *WHIRLY1*-Überexpressionslinien (3.3.2.2) durchgeführt (2.2.2).

Samen von Pflanzen, in denen *WHIRLY1*:HA nur im Zellkern akkumuliert (*nWHIRLY1*:HA), keimten bei Zugabe von ABA-Konzentrationen von 2 bis 20  $\mu\text{M}$  besser als der Wildtyp und weisen somit die gleiche Unempfindlichkeit gegenüber ABA auf wie die *why1*-Mutanten (Abb. E28). Die Überexpressionslinie *pnWHIRLY1*, die *WHIRLY1*:HA im Zellkern und den Plastiden besitzt, ist jedoch während der Keimung sehr viel sensibler gegenüber ABA als der Wildtyp. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  keimten weniger als 10 % der Samen zweier unabhängiger *pnWHIRLY1*:HA Linien (-1 und -2), während 60 % der Samen des Wildtyps bei dieser ABA-Konzentration keimten (Abb. E28). Folglich scheint lediglich die in Plastiden lokalisierte Isoform von *WHIRLY1* für die Sensitivität der Samen gegenüber ABA wichtig zu sein.

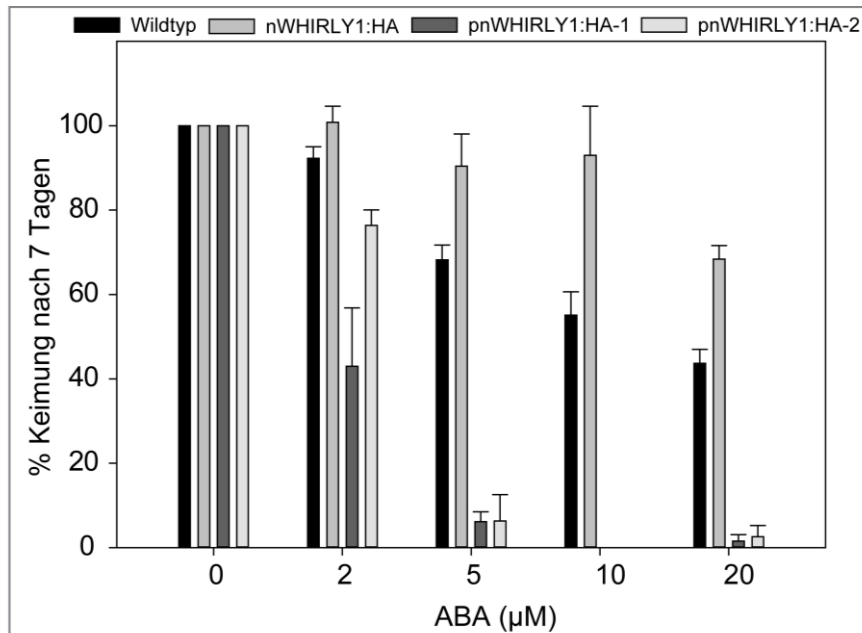


Abb. E28: Hemmung der Keimung durch Abscisinsäure (ABA). Samen der Überexpressionslinien nWHIRLY1:HA, pnWHIRLY1:HA-1 und pnWHIRLY1:HA-2 sowie des Wildtyps wurden auf agarhaltigem Medium mit 2 bis 20 µM ABA angezogen. Der prozentuale Anteil an Samen mit sichtbarer Keimwurzel wurde nach siebentägiger Anzucht ermittelt. Dargestellte Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SE aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 20 bis 50 Samen. Die Prozentwerte in den Kontrollexperimenten ohne ABA wurden auf 100 % festgesetzt.

#### 3.3.3.5 Einfluss von Abamin auf die Hemmung der Keimung durch Abscisinsäure

Die Ergebnisse zur Keimung der Linien pnWHIRLY1:HA und nWHIRLY1:HA (3.3.3.4) deuten darauf hin, dass die in Plastiden lokalisierte Form von WHIRLY1 die Sensitivität von Samen gegenüber ABA erhöht. Eine Wahrnehmung von ABA innerhalb der Plastiden ist jedoch überraschend, bedenkt man, dass ABA exogen zugefügt wurde und auch das endogene ABA im Cytoplasma entsteht (Cutler et al., 2010; Seo und Koshiba, 2011). Es wäre möglich, dass der in den Keimungsversuchen beobachtete Effekt nicht auf ABA sondern auf das Vorläufermolekül Xanthoxin zurück zu führen ist. Xanthoxin befindet sich innerhalb der Chloroplasten und könnte dort mit Hilfe von WHIRLY1 wahrgenommen werden.

Um zu untersuchen, ob der inhibitorische Effekt, den die zugegebene Abscisinsäure auf die Keimung hat, durch eine Veränderung der endogenen Menge an Xanthoxin hervorgerufen wird, wurde die Keimung in Gegenwart von Abamin untersucht (2.2.2). Durch Zugabe von Abamin wird die Neubildung von Xanthoxin und folglich auch von ABA verhindert, wodurch Samen des Wildtyps von *A. thaliana* schneller keimten (Abb. E29). Wurde nur ABA oder ABA und Abamin zugegeben, war die Keimung der Samen um etwa 50 % reduziert (Abb. E29). Der inhibitorische Effekt von ABA auf die Keimung wird folglich nicht durch einen Anstieg der Xanthoxinmenge vermittelt.

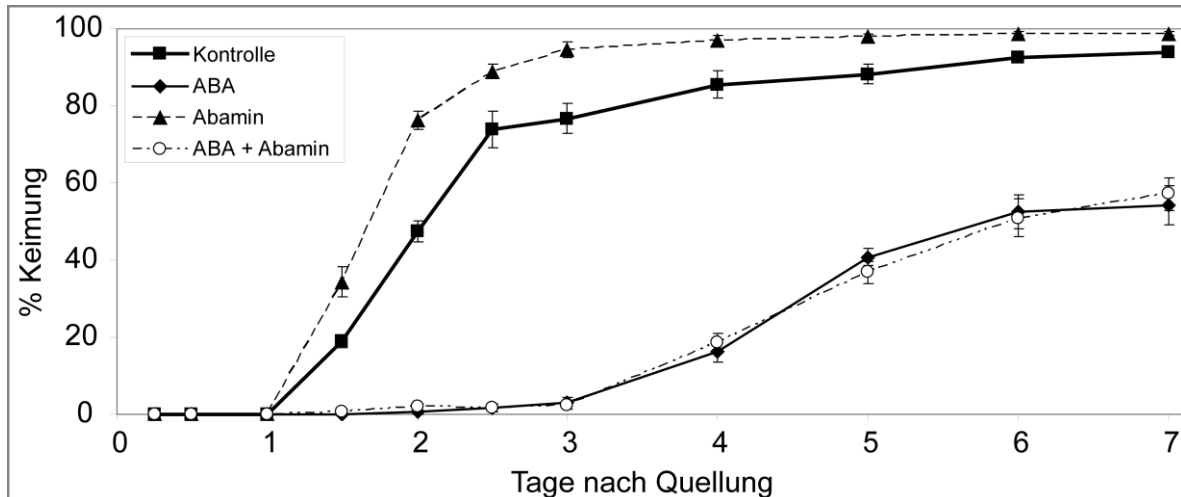


Abb. E29: Einfluss von Abamin auf die Keimung in Gegenwart von Abscisinsäure (ABA). Samen des Wildtyps wurden auf agarhaltigem Medium ohne Zusatz (Kontrolle), mit 10  $\mu$ M ABA, 50  $\mu$ M Abamin oder 10  $\mu$ M ABA + 50  $\mu$ M Abamin gekeimt. Der prozentuale Anteil an Samen mit sichtbarer Keimwurzel wurde während der ersten sieben Tage nach Quellung täglich ermittelt. Dargestellte Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SE aus fünf unabhängigen Experimenten mit jeweils 20 bis 50 Samen.

#### 3.3.3.6 Einfluss von Abscisinsäure und Salicylsäure auf die Keimung von WHIRLY-Mutanten

In *A. thaliana* scheint WHIRLY1 wichtig für die Sensitivität von Samen gegenüber ABA zu sein (3.3.3.1). Um zu testen, ob dies auch für die nahe verwandten Proteine WHIRLY2 und WHIRLY3 gilt, wurden ABA-Keimungsversuche mit den Mutanten *why2*, *til-why3* und *why1-p x til-why3* sowie dem Wildtyp durchgeführt (2.2.2). Zusätzlich wurde die *abi4*-Mutante untersucht.

Im Unterschied zu den zuvor untersuchten *why1*-Mutanten (3.3.3.1) wurde für die Mutanten *til-why3* und *why1-p x til-why3* keine deutliche Insensitivität gegenüber ABA während der Keimung beobachtet. Bei ABA-Konzentrationen von 5, 10 und 20  $\mu$ M wurden für die Mutanten lediglich 5 bis 20 % mehr keimende Samen als für den Wildtyp beobachtet (Abb. E30A). Besonders die Befunde zur *why1-p x til-why3*-Mutante sind unerwartet. Für die Doppelmutante wurde eine ähnliche Insensitivität gegenüber ABA wie für die *why1*-Mutanten erwartet (3.3.3.1).

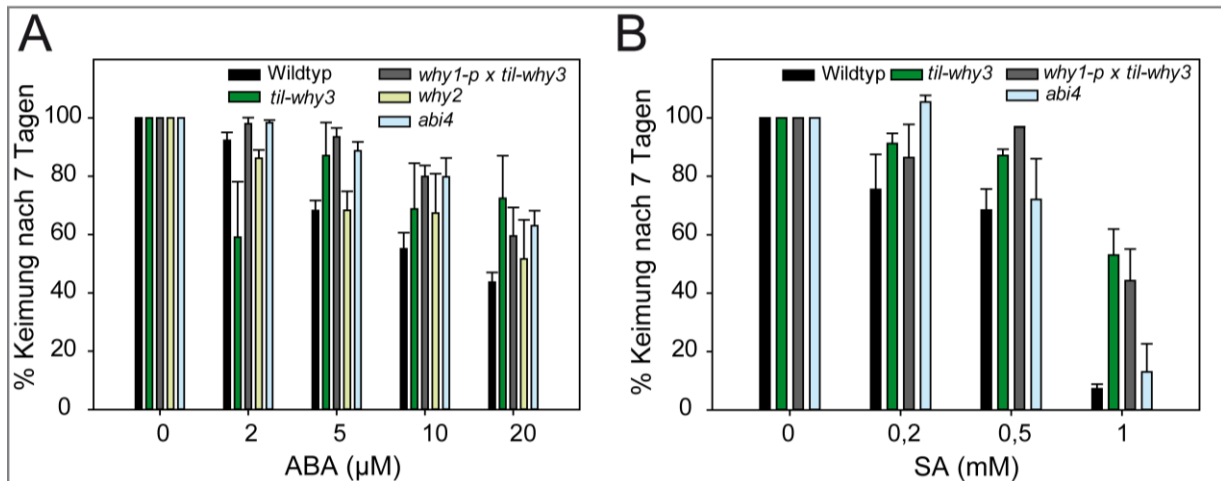


Abb. E30: Hemmung der Keimung durch Abscisinsäure (ABA) bzw. Salicylsäure (SA). Samen der Mutanten *til-why3*, *why2* und *why1-p x til-why3* sowie des Wildtyps wurden auf agarhaltigem Medium mit 2 bis 20 μM ABA (**A**) bzw. 0,2 bis 1 mM SA (**B**) angezogen. Samen der Mutante *abi4* kamen als Kontrolle zum Einsatz. Der prozentuale Anteil an Samen mit sichtbarer Keimwurzel wurde nach siebentägiger Anzucht ermittelt. Dargestellte Werte sind Mittelwerte ± SE aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 20 bis 50 Samen. Die Prozentwerte in den Kontrolleexperimenten ohne SA wurden auf 100 % festgesetzt.

Die Mutante *why2* zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp während der Keimung auf ABA-haltigem Medium (Abb. E30A). Die *abi4*-Mutante zeigte bei allen untersuchten ABA-Konzentrationen eine niedrige Sensitivität gegenüber ABA und hatte eine um mindestens 20 % erhöhte Keimungsrate im Vergleich zum Wildtyp (Abb. E30A).

Samen der *why1*-Mutanten sind nicht nur gegenüber ABA, sondern auch gegenüber SA insensitiv (3.3.3.1). Obwohl die Mutanten *til-why3* und *why1-p x til-why3* keine deutliche Insensitivität gegenüber ABA zeigten, waren Samen der Mutanten dennoch unempfindlicher gegenüber der Wirkung von SA als Samen des Wildtyps. Die Unempfindlichkeit zeigte sich besonders bei einer hohen Konzentration von 1 mM SA. Hier keimten mehr als 40 % der Samen der Mutanten während der Wildtyp nur zu 10 % keimte (Abb E30B). Die *abi4*-Mutante, die auf Grund ihrer Unempfindlichkeit gegenüber ABA während der Keimung entdeckt wurde (Finkelstein et al., 1998), zeigte in dem Keimungsversuch ebenfalls eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber SA, die besonders auffällig bei relativ niedrigen Konzentrationen von 0,2 mM SA war (Abb. E30B).

Um zu untersuchen, ob die Unempfindlichkeit einiger *WHIRLY*-Mutanten gegenüber SA bzw. ABA nicht nur während der Keimung sondern auch in anderen Entwicklungsstadien zu beobachten ist, wurden Rosettenblätter von vier bzw. fünf Wochen alten Pflanzen mit SA bzw. ABA behandelt. Die Mutanten reagierten genauso wie der Wildtyp auf die Behandlung mit dem jeweiligen Phytohormon (Anhang Abb. A10, A11). Die Unempfindlichkeit von *WHIRLY*-Mutanten gegenüber ABA und SA scheint somit spezifisch für die Keimung zu sein.

### 3.3.4 Untersuchungen zur Funktion von WHIRLY1 bei der Übertragung retrograder Plastidensignale

Da für das dual lokalisierte WHIRLY1-Protein eine Umverteilung aus den Plastiden in den Zellkern gezeigt wurde, ist es ein idealer Kandidat für die Übertragung von plastidären Signalen zum Zellkern (3.1.3; Isemer et al., 2012a; Krause et al., 2012). Hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber ABA und SA während der Keimung sind *why1*-Mutanten vergleichbar mit Mutanten, die in der Übertragung plastidärer Signale gestört sind, den sogenannten *gun*-Mutanten (3.3.3.3). Dieser Befund weist zusätzlich auf eine mögliche Funktion von WHIRLY1 während der Informationsübertragung von den Plastiden zum Zellkern hin.

Um weitere Hinweise auf eine Funktion von WHIRLY1 als Überträger retrograder Signale zu erhalten, wurde untersucht, ob die *why1*-Mutanten und die *WHIRLY1*-Überexpressionslinien zu den *gun*-Mutanten gezählt werden können. Nach Störung der Chloroplastenentwicklung senden die Plastiden Signale an den Zellkern, die die Expression von im Zellkern kodierten Plastidengen wie zum Beispiel *LHCB* und *RBCS* hemmt. *Gun*-Mutanten, denen Proteine fehlen, die an der Signalübertragung beteiligt sind, zeigen bei Störung der Chloroplastenentwicklung eine schwächere transkriptionelle Hemmung der Gene *LHCB* und *RBCS* als der Wildtyp (1.2.2). Um die Entwicklung der Chloroplasten zu stören, wurden Norflurazon (NF) oder Lincomycin (LN) eingesetzt (Susek et al., 1993; Koussevitzky et al., 2007; Ruckle et al., 2007; Sun et al., 2011). NF ist ein Herbizid, das die Carotinoidbiosynthese in den Plastiden blockiert (Sandmann und Böger, 1989). Carotinoide sind unter anderem Ausgangsstoffe für die Herstellung von Chlorophyll (Eckhardt et al., 2004). Das Antibiotikum LN hemmt die große Untereinheit der plastidären Ribosomen und stört so die Proteinbiosynthese in den Plastiden. Störungen in der Translation in Plastiden wurden als ein möglicher Auslöser von retrograden Signalen von Plastiden zum Zellkern diskutiert (1.2.1).

#### 3.3.4.1 Untersuchungen an WHIRLY1-Mutanten

Um zu untersuchen, ob *why1*-Mutanten zu den *gun*-Mutanten gezählt werden können, wurden Samen der *why1-1*- und *why1-2*-Mutante sowie des Wildtyps für sechs Tage auf MS-Medium mit und ohne Zugabe von NF angezogen (2.2.2). Wie erwartet bilden Keimlinge, die auf MS-Medium mit NF angezogen wurden, kein Chlorophyll (Anhang Abb. A12A). Weiterhin war in den mit NF behandelten Keimlingen die Expression des Gens *LHCB1.3* stark reduziert im Vergleich zur *LHCB1.3*-Expression in grünen, unbehandelten Keimlingen (Anhang Abb. A12B). Eine quantitative *Real-Time* PCR (2.4.10) zeigte, dass *why1*-Keimlinge bei Anzucht auf NF eine größere Menge an *LHCB1.3*-mRNA, aber nicht an *RBCS*-mRNA synthetisieren als der Wildtyp (Abb. E31A, B). Die *LHCB1.3*-Transkriptmenge war in der *why1-1*-Mutante fast viermal, in der *why1-2*-Mutante sogar zehnmal höher als im Wildtyp (Abb. E31A). In unbehandelten Keimlingen hingegen waren keine Unterschiede in

der *LHCB1.3*- und *RBCS*-Transkriptmenge zwischen den *why1*-Mutanten und dem Wildtyp festzustellen (Anhang Abb. A13). Der Einfluss von WHIRLY1 auf die *LHCB1.3*-Transkriptmenge war somit nur bei einer beeinträchtigten Chloroplastenentwicklung messbar. Folglich können die beiden *why1*-Mutanten zu den *gun*-Mutanten gezählt werden, wobei WHIRLY1 unter den verwendeten Bedingungen nur einen Einfluss auf die *LHCB1.3*-Genexpression und nicht auf die des *RBCS*-Gens hat. Im Vergleich zu den untersuchten *gun*-Mutanten ist die verminderte Unterdrückung der Expression in *why1*-Mutanten jedoch nur schwach. Die *LHCB1.3*-Transkriptmenge in der *gun1-1*-Mutante war etwa 8- bzw. 3,5-mal, die in der *gun1-102*-Mutante etwa 16- bzw. 6,5-mal und die in der *gun5*-Mutante etwa 6- bzw. 2,5-mal höher als in den Mutanten *why1-1* bzw. *why1-2* (Abb. E31A).

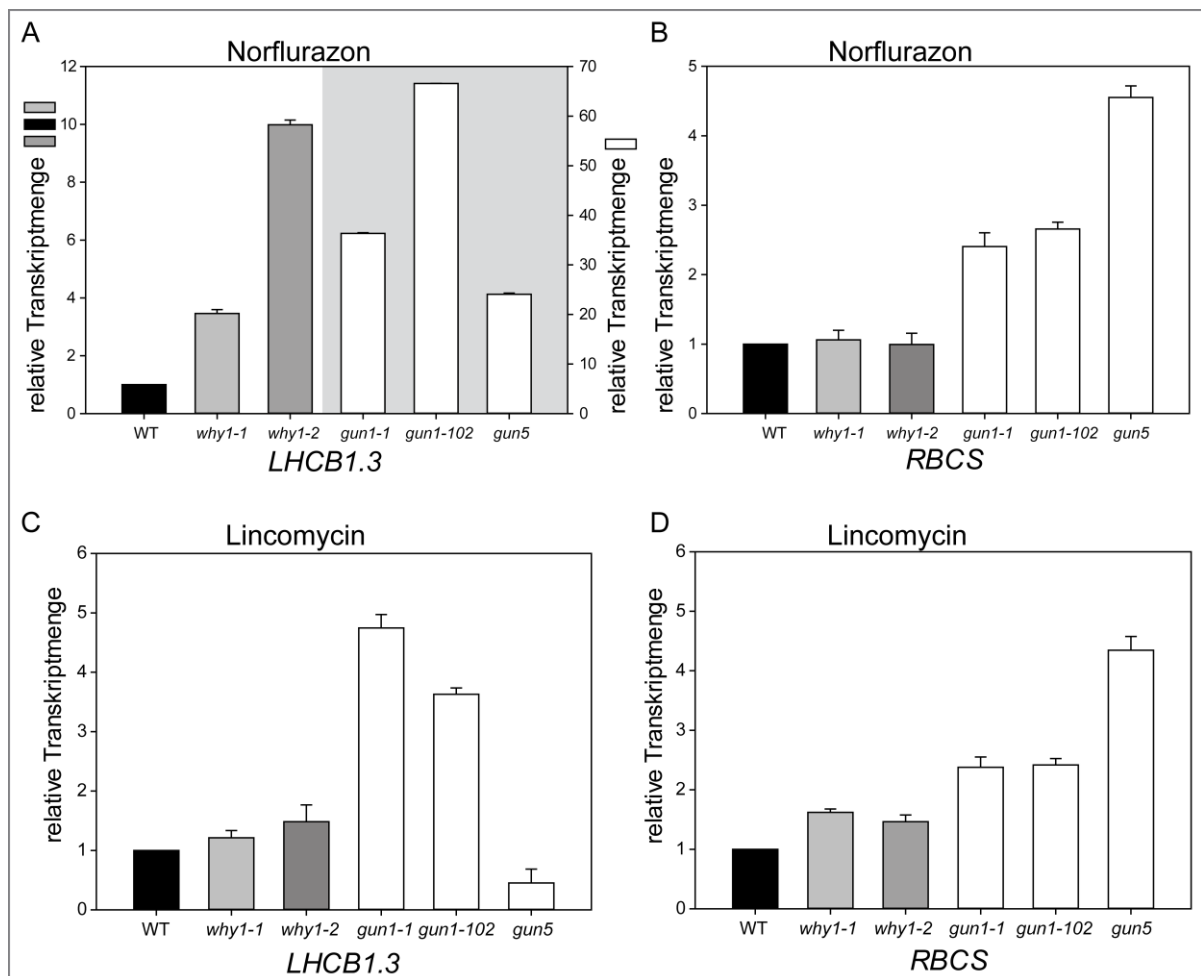


Abb. E31: Analyse der Transkriptmenge in den Mutanten *why1-1* und *why1-2* mittels quantitativer *Real-Time* PCR. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für sechs Tage auf MS-Medium, das jeweils 5  $\mu$ M Norflurazon (**A, B**) bzw. 220  $\mu$ g/ml Lincomycin (**C, D**) enthielt. Die relativen Transkriptmengen der Gene *LHCB1.3* (**A, C**) und *RBCS* (**B, D**) in den Mutanten wurden mit denen des Wildtyps verglichen. Vergleichend wurde die Expression in *gun1-1*-, *gun1-102*- und *gun5*-Mutanten ermittelt. Als Kontrollgen wurde *ACTIN2* genutzt. Die Transkriptmengen im Wildtyp sind auf den Wert 1 normiert, auf den sich alle weiteren Werte beziehen. Standardabweichungen wurden aus drei technischen Replikaten berechnet. In A sind die grau hinterlegten relativen Transkriptmengen der *gun*-Mutanten von der rechten Y-Achse abzulesen.

Um zu testen, ob das WHIRLY1-Protein bei der Übertragung retrograder Signale als Folge gehemmter plastidärer Translation eine Funktion hat, wurden Samen der *why1-1*- und *why1-2*-Mutante sowie des Wildtyps für sechs Tage auf MS-Medium mit und ohne Zugabe von LN angezogen (2.2.2). Die Hemmung der plastidären Translation durch LN führte zu einer gestörten Chloroplastenentwicklung. Die Keimlinge zeigten eine blass rosa Färbung (Anhang Abb. A14A). Weiterhin war in den mit LN behandelten Keimlingen die *LHCB1.3*-Transkriptmenge stark reduziert im Vergleich zu unbehandelten, grünen Keimlingen (Anhang Abb. A14B). Das Fehlen des WHIRLY1-Proteins in den *why1-1* und *why1-2*-Mutanten führte jedoch nach Behandlung mit LN nicht zu einer veränderten Transkriptmenge der Gene *LHCB1.3* und *RBCS* (Abb. E31C, D). Höhere Transkriptmengen der beiden untersuchten Gene waren im Vergleich zu Keimlingen des Wildtyps nur in Keimlingen der Mutanten *gun1-1* und *gun1-102* nachweisbar. Die *gun5*-Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp nach Behandlung mit LN eine etwa halb so hohe *LHCB1.3*-Transkriptmenge (Abb. E31C). Die *RBCS*-Transkriptmenge in der *gun5*-Mutante war hingegen um mehr als das Vierfache erhöht (Abb. E31D).

#### 3.3.4.2 Untersuchungen an WHIRLY1-Überexpressionslinien

Um zu untersuchen, ob die Plastiden- oder die Kernform von WHIRLY1 an der transkriptionellen Hemmung des *LHCB1.3*-Gens beteiligt ist, wurden die transgenen Linien, die entweder die vollständige WHIRLY1-Sequenz (pnWHIRLY1:HA) oder eine verkürzte WHIRLY1-Sequenz ohne die plastidäre Importsequenz (nWHIRLY1:HA) überexprimieren (3.3.2.2), mit NF und LN behandelt. Quantitative *Real-Time* PCR Analysen ergaben, dass die Transkriptmenge des *LHCB1.3*-Gens bei Anzucht auf NF in der pnWHIRLY1:HA Linie ähnlich hoch wie im Wildtyp war (Abb. E32A). In der transgenen Linie nWHIRLY1:HA war die Menge an *LHCB1.3*-Transkript hingegen mehr als dreimal so hoch wie im Wildtyp (Abb. E32A) und entsprach damit der Menge, die in der *why1-1*-Mutante nach Behandlung mit NF gemessen wurde (3.3.4.1, Abb. 31A). Zum Vergleich sind die Transkriptmengen in den *gun*-Mutanten gezeigt (Abb. E32A). In den transgenen Linien wurden, wie auch bei den *why1*-Mutanten, keine Unterschiede in der *RBCS*-Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (Abb. E32B). Unter Kontrollbedingungen ohne NF gab es keine Unterschiede in den *LHCB1.3*- und *RBCS*-Transkriptmengen zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp (Anhang Abb. A15).

Die transgenen Überexpressionslinien wurden auf MS-Medium mit LN angezogen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in den *why1*-Mutanten war auch in den beiden WHIRLY1-Überexpressionslinien die Transkriptmenge des Gens *RBCS* nicht verändert (Abb. E32C, D). Die *LHCB1.3*-Transkriptmenge in der pnWHIRLY1:HA Linie war allerdings fast doppelt so hoch wie im Wildtyp und in der nWHIRLY1:HA Linie war sie auf etwa 60 % reduziert (Abb. E32C). Ob diese geringen Abweichungen von der Transkriptmenge des Wildtyps tatsächlich auf WHIRLY1 zurückgeführt werden können, ist fraglich. Eventuell könnten weiterführende Analysen der



### 3. Ergebnisse

Transkriptmengen anderer *LHCB*-Gene dies klären. Nach Behandlung mit LN wurden in Keimlingen der *gun*-Mutanten, wie bereits beschrieben (3.3.4.1), für beide untersuchten Gene stets höhere Transkriptmengen als im Wildtyp festgestellt, mit Ausnahme der *LHCB1.3*-Transkriptmenge in der *gun5*-Mutante, welche nach Behandlung mit LN niedriger als im Wildtyp war (Abb. E32C).

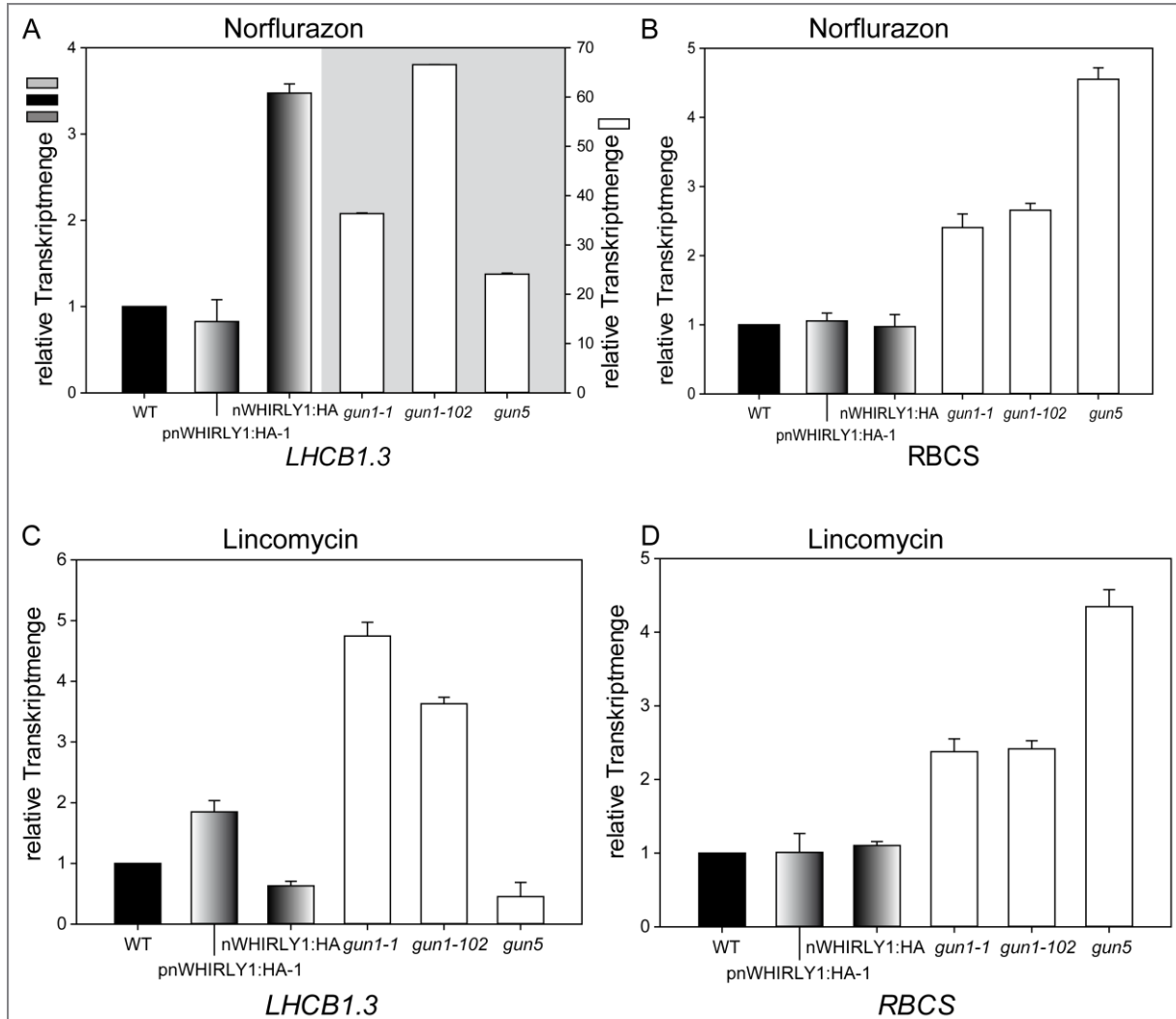


Abb. E32: Analyse der Transkriptmengen in den transgenen *WHIRLY1*-Überexpressionslinien, in denen das rekombinante *WHIRLY1:HA*-Protein entweder in Plastiden und Zellkern (pn*WHIRLY1:HA*) oder nur im Zellkern (n*WHIRLY1:HA*) akkumuliert, mittels quantitativer *Real-Time* PCR. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für sechs Tage auf MS-Medium, das jeweils 5  $\mu$ M Norflurazon (**A, B**) bzw. 220  $\mu$ g/ml Lincomycin (**C, D**) enthielt. Die relativen Transkriptmengen der Gene *LHCB1.3* (**A, C**) und *RBCS* (**B, D**) in den Mutanten wurden mit denen des Wildtyps verglichen. Vergleichend wurden Expressionsdaten in *gun1-1*-, *gun1-102*- und *gun5*-Mutanten ermittelt. Als Kontrollgen wurde *ACTIN2* genutzt. Die Transkriptmengen im Wildtyp sind auf den Wert 1 normiert, auf den sich alle weiteren Werte beziehen. Standardabweichungen wurden aus drei technischen Replikaten berechnet. In A sind die grau hinterlegten relativen Transkriptmengen der *gun*-Mutanten von der rechten Y-Achse abzulesen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Lokalisation der WHIRLY-Proteine von *Arabidopsis thaliana*

#### 4.1.1 Subzelluläre Lokalisation von WHIRLY1

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein rekombinantes WHIRLY1:HA-Protein in Zellkern- und Chloroplastenfraktionen aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*, L.) immunologisch nachgewiesen (3.1.1). Damit ist gezeigt, dass WHIRLY1 in *A. thaliana* wie in Gerste (Grabowski et al., 2008) dual lokalisiert ist und in beiden Kompartimenten das gleiche Molekulargewicht hat (Abb. E1).

Bis heute sind nur sehr wenige dual lokalisierte Proteine bekannt, die in zwei verschiedenen Kompartimenten die gleiche Größe haben (1.3). Ein Beispiel ist das SEBF-Protein (*silencing element binding factor*), für das Western Blot Analysen mit isolierten Zellfraktionen die gleiche molekulare Größe in Chloroplasten und Zellkernen zeigten (Boyle und Brisson, 2001). SEBF bindet wie WHIRLY1 an einzelsträngige DNA und unterdrückt die Transkription des *PR10a*-Gens über Bindung an dessen Promotor. Da WHIRLY1 ein Aktivator der *PR10a*-Genexpression ist, wird vermutet, dass SEBF nach Induktion durch ein Pathogen vom *PR10a*-Promotor dissoziiert, worauf WHIRLY1 an den Promotor binden kann (Gonzalez-Lamothe et al., 2006). SEBF und WHIRLY1 könnten zunächst in den Plastiden gespeichert und angeregt durch verschiedene Signale in den Kern umverteilt werden, um dort als Transkriptionsfaktoren zu wirken. Denkbar ist, dass Phytohormone wie Salicylsäure (SA) oder Abscisinsäure (ABA), die nach Infektion von Pflanzen verstärkt in Plastiden gebildet werden (Cao et al., 2011), die Umverteilung der Transkriptionsfaktoren bewirken. Plastiden hätten folglich eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Pathogenen. Dementsprechend wurde vor kurzem gezeigt, dass durch Infektion mit Pathogenen die Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  im Stroma der Plastiden ansteigt. Dieser Anstieg verstärkt die Biosynthese von Salicylsäure und induziert die Expression von Abwehrgenen im Zellkern über retrograde Signale, die durch ROS ausgelöst werden (Nomura et al., 2012).

Vorangehende mikroskopische Studien zur subzellulären Lokalisation von WHIRLY1 (Krause et al., 2005; Maréchal et al., 2009; Melonek et al., 2010) wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt und ergänzt. In stabil transformierten Linien von *A. thaliana* waren die Fluoreszenzsignale von AtWHIRLY1:GFP- bzw. :RFP-Fusionsproteinen mit der roten Autofluoreszenz des Chlorophylls überlagert (3.1.4). Dies bestätigt, dass WHIRLY1 und Thylakoide kolokalisieren. Wie zuvor schon beobachtet, sind die Fluoreszenzsignale der WHIRLY1-Fusionsproteine punktförmig verteilt, wie es für ein mit den Nukleoiden assoziiertes Protein zu erwarten ist (Pfalz et al., 2006; Melonek et al., 2010; Majeran et al., 2012; Krupinska et al., 2012). Neu war allerdings die Detektion von unterschiedlich großen Signalen (Abb. E7). Es ist möglich, dass diese Signale verschieden große Nukleoide repräsentieren.

#### 4.1.2 Die Umverteilung von WHIRLY1 aus Plastiden in den Zellkern

Die molekulare Größe von WHIRLY1 im Zellkern und den Chloroplasten entspricht der theoretischen Größe des prozessierten Proteins in Plastiden (3.1.1; Grabowski et al., 2008). Es stellt sich die Frage, wie WHIRLY1 nach seiner Synthese im Cytoplasma auf die beiden Kompartimente verteilt wird. Eine Möglichkeit wäre, dass die in Plastiden lokalisierte WHIRLY1-Isoform aus einem längeren Transkript entsteht als die im Zellkern lokalisierte Isoform. Beim Import in die Plastiden würde das Vorstufenprotein, welches durch das längere Transkript kodiert ist, prozessiert und das reife Protein hätte in den Plastiden das gleiche Molekulargewicht wie die WHIRLY1-Isoform im Zellkern. Für andere dual lokalisierte Proteine wie zum Beispiel die DNA Ligase 1 aus *A. thaliana* wurde bereits gezeigt, dass die Isoformen aus unterschiedlichen Transkripten entstehen (Sunderland et al., 2006). Durch *RLM-RACE* Analysen wurden jedoch weder für *WHIRLY1* noch für *WHIRLY3* und *WHIRLY2* Transkripte mit unterschiedlichen Längen nachgewiesen (3.1.2). Es war jeweils nur ein *WHIRLY*-Transkript nachweisbar, dessen Länge der vollständigen cDNA-Sequenz entsprach. Die besondere duale Lokalisation von WHIRLY1 lässt sich daher nicht auf die Translation unterschiedlicher Transkripte zurückführen.

In der vorliegenden Arbeit konnte an einer Plastomtransformante des Tabaks gezeigt werden, dass die vermutete Umverteilung von WHIRLY1 aus Plastiden in den Zellkern (Grabowski et al., 2008; Krause und Krupinska, 2009) tatsächlich statt finden kann. In Blättern einer Plastomtransformantenlinie, welche AtWHIRLY1 in Fusion mit einem HA-Tag in den Chloroplasten synthetisiert, akkumuliert das rekombinante Protein im Zellkern (3.1.3; Isemer et al., 2012a). Auch in mikroskopischen Dünnschnitten von Blättern der Plastomtransformante wurde das WHIRLY1:HA-Protein immunologisch im Zellkern nachgewiesen (Isemer et al., 2012a). Dies deutet darauf hin, dass das WHIRLY1-Vorstufenprotein zunächst an 80S-Ribosomen im Cytoplasma synthetisiert, dann in die Plastiden importiert und dort prozessiert wird. Das prozessierte WHIRLY1 wird anschließend offensichtlich aus dem Organell in den Zellkern umverteilt (Abb. D1A). Die Umverteilung des WHIRLY1-Proteins aus den Plastiden in den Zellkern stellt eine neue Möglichkeit für die subzelluläre Verteilung von Proteinen in Pflanzen dar. Auch für das dual lokalisierte PEND-Protein, welches wie WHIRLY1 ein Bestandteil des TAC ist, wird ein ähnlicher Mechanismus zur Verteilung in der Zelle vermutet (Terasawa und Sato, 2009).

Der molekulare Mechanismus, der zur Umverteilung von WHIRLY1 führt, ist unbekannt. Die denkbar einfachste Möglichkeit wäre eine Freisetzung des Proteins aus zerstörten Chloroplasten (Krause und Krupinska, 2009; Krause et al., 2012) (Abb. D1B). Chloroplasten können durch eine vermehrte Bildung von ROS, wie sie in Stresssituationen wie zum Beispiel Starklichtbedingungen auftritt, zerstört werden (Kim et al., 2012). Jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit die Umverteilung von WHIRLY1 an Blättern beobachtet, die keinem offensichtlichen Stress ausgesetzt waren (3.1.3). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass durch die Anzucht in Petri-

schalen bzw. im Gewächshaus (2.2.3) unbeabsichtigt Stress hervorgerufen wurde, der zur Freisetzung von WHIRLY1 aus den Chloroplasten führte.

Neben der Freisetzung von WHIRLY1 aus zerstörten Plastiden kommt auch ein aktiver Übergang mittels eines bisher unbekannten Systems für die Umverteilung in den Zellkern in Frage (Krause und Krupinska, 2009; Krause et al., 2012) (Abb. D1B). Es ist durchaus möglich, dass Plastiden, welche aus einem bakteriellen Endosymbionten entstanden sind, ein Exportsystem besitzen (Settles und Martienssen, 1998). Bakterien können mit Hilfe verschiedener Transportsysteme, wie zum Beispiel über den sekretorischen Weg (*Sec-pathway*) und den *Tat*-Weg (*twin-arginine-translocation*) Proteine abgeben (Tjalsma et al., 2000). In höheren Pflanzen wurden die Komponenten des sekretorischen Weges und des *Tat*-Weges bisher nur in Thylakoiden und nicht in der Plastidenhüllmembran nachgewiesen. In den Plastiden der Glaucocystaceae, sogenannten Cyanellen, findet man den sekretorischen Weg jedoch auch in der Hüllmembran (Yusa et al., 2008). Aus Mitochondrien der Hefe werden Peptide mit Hilfe eines ABC-Transporters (*ATP-binding cassette*) exportiert (Young et al., 2001; Augustin et al., 2005). Auch in Pflanzen gibt es verschiedene ABC-Transporter, die als Kandidaten für einen Export über die plastidäre Hüllmembran in Frage kämen (Krause und Krupinska, 2009). Eventuell kann auch der Importapparat der Plastiden so modifiziert werden, dass er Proteine exportieren kann. Hieran könnten Homologe der Ubiquitin-Ligase SP1 beteiligt sein, welche in der Plastidenhüllmembran zu finden sind, deren Funktionen bisher jedoch unbekannt sind. SP1 verändert die Aktivität des Importapparates während der Entwicklung. So kann der Import von Proteinen dem Entwicklungszustand der Plastiden angepasst werden (Ling et al., 2012; Kessler, 2012). Der Importapparat der Mitochondrien ist tatsächlich in der Lage, bestimmte Proteine zu exportieren. Ein Beispiel hierfür ist die mitochondriale Fumarase in *S. cerevisiae*. Das Vorstufenprotein der Fumarase gelangt in den Importapparat und wird prozessiert. Etwa 70 % der prozessierten Fumarase-Proteine gelangen zurück ins Cytosol (Knox et al., 1998).

Sowohl Bakterien als auch Mitochondrien sind in der Lage, Vesikel an ihre Umgebung abzugeben (Soltys und Gupta, 1996; Li et al., 1998; Andrade-Navarro et al., 2009). Daher wäre auch ein Export von Proteinen aus Plastiden durch Abschnürung von Vesikeln denkbar (Krause und Krupinska, 2009; Krause et al., 2012) (Abb. D1B). In der Tat können Plastiden unter bestimmten Bedingungen Vesikel abgeben. Zum Beispiel wurden in seneszenten Blättern die sogenannten *RuBisCo containing bodies* beobachtet, in denen RuBisCo und andere Stromaproteine aus den Chloroplasten transportiert werden, um abgebaut zu werden (Chiba et al., 2003). Fusionsproteine aus WHIRLY1 und GFP wurden weder in transienten Versuchsansätzen (Krause et al., 2005; Maréchal et al., 2009; Melonek et al., 2010) noch in stabil transformierten Pflanzen (3.1.4) im Zellkern detektiert. Das WHIRLY1-Fusionsprotein ist mit einer Größe von über 50 kDa zu groß, um die Kernporen passiv passieren zu können (Gorlich, 1998; Krause et al., 2005). Ein Transport über Vesikel würde die Kernporen umgehen und auch die großen WHIRLY1:GFP-Fusionsproteine wären dann in der Lage, in den Zellkern zu gelangen.

Eine weitere Möglichkeit für die Umverteilung von WHIRLY1 ist ein direkter Kontakt zwischen dem Organell und dem Zellkern, der zum Beispiel über Stromuli hergestellt werden könnte (Krause und Krupinska, 2009; Krause et al., 2012) (Abb. D1B). Stromuli (*stroma filled tubules*) sind mit Stroma gefüllte Plastidenfortsätze. Sie sind von beiden Hüllmembranen umgeben, enthalten allerdings keine Thylakoide und können daher nicht über Chlorophyllfluoreszenz detektiert werden (Krupinska et al., 2010). Erst in transgenen Farnen, Moosen und höheren Pflanzen, die GFP im plastidären Stroma besitzen, konnten Stromuli mikroskopisch nachgewiesen werden (Köhler et al., 1997; Köhler und Hanson, 2000; Gunning, 2005). Von den Spitzen der Stromuli können sich Vesikel abschnüren (Gunning, 2005). Falls WHIRLY1 in Vesikeln aus Stromuli in den Zellkern umverteilt wird, wäre zu erwarten, dass WHIRLY1:GFP-Fusionsproteine auch im Zellkern akkumulieren können.

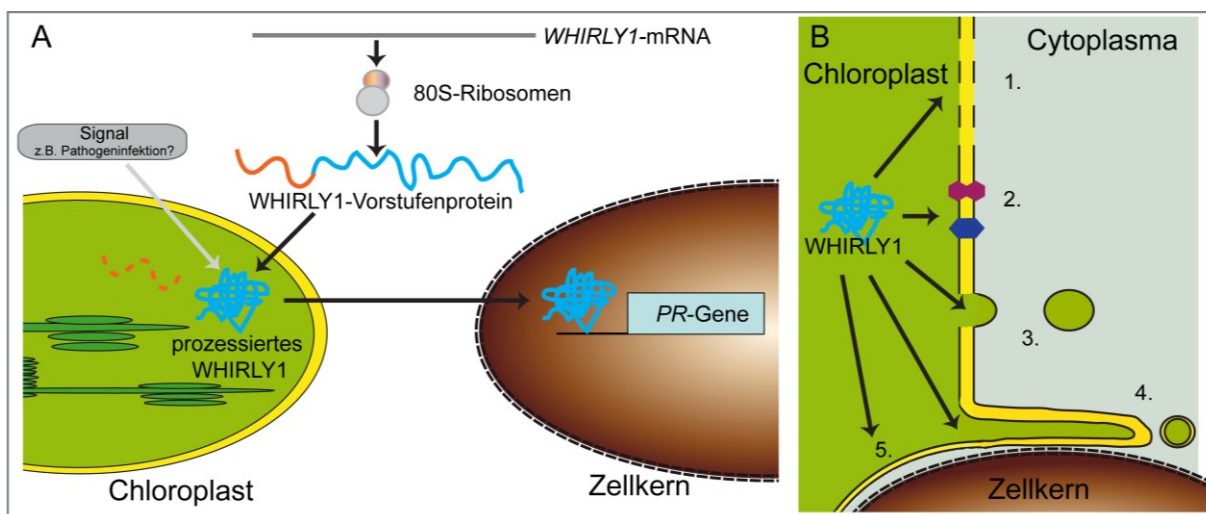


Abb. D1: Modell zur Umverteilung von WHIRLY1 aus Plastiden in den Zellkern. **A** Das WHIRLY1-Vorstufenprotein wird im Cytoplasma an 80S-Ribosomen aus der WHIRLY1-mRNA synthetisiert. Nach Import in die Chloroplasten wird die Importsequenz abgespalten. Ausgelöst durch ein unbekanntes Signal, bei dem es sich um eine Infektion mit Pathogenen handeln könnte, wird das prozessierte WHIRLY1-Protein aus den Plastiden freigesetzt. Im Zellkern wirkt WHIRLY1 als Transkriptionsfaktor. **B** WHIRLY1 könnte über zerstörte Plastidenhüllmembranen (1.) oder durch ein bisher unbekanntes Exportsystem (2.) die Plastiden verlassen. Weitere Möglichkeiten für einen Export aus Plastiden sind Vesikel (3.), Stromuli bzw. Vesikel aus Stromuli (4.) oder ein enger Kontakt zwischen den Kompartimenten (5.).

Nicht nur der Mechanismus zur Umverteilung von WHIRLY1 sondern auch der physiologische Auslöser für den Export aus den Plastiden ist unbekannt. Ein möglicher Auslöser könnte eine Infektion mit Pathogenen sein (Abb. D1A). Dies wäre in Übereinstimmung mit einem Modell, nachdem die Bindung von WHIRLY1 an Promotoren von *PR*-Genen durch SA aktiviert wird (Desveaux et al., 2002, 2004). SA ist das einzige Pflanzenhormon, dessen Synthese vollständig in Plastiden abläuft (Wildermuth et al., 2001). Es wäre möglich, dass durch die Pathogeninfektion gebildete Salicylsäure zur Freisetzung von WHIRLY1 aus den Plastiden führt. Somit stünde die SA-vermittelte Pathogenabwehr der Pflanze unter Kontrolle der Plastiden (Nomura et al.,

2012). WHIRLY1:HA-Proteine, die in den Chloroplasten der Plastomtransformante synthetisiert wurden, erhöhen die Transkriptmenge von *PR*-Genen, jedoch nicht die von *Kinesin*-Genen (Abb. E6). Das rekombinante WHIRLY1:HA-Protein wirkt folglich auf die *PR*-Gene ähnlich wie das endogene WHIRLY1-Protein.

Auch andere dual lokalisierte Proteine sind für die Pathogenabwehr bedeutsam. Hierzu gehört das in den Chloroplasten lokalisierte NRIP1-Protein (*N receptor-interacting protein 1*). NRIP1 ist ein Interaktionspartner des an der Erkennung des Tabakmosaikvirus beteiligten N-Immunrezeptors. Vermittelt durch das Protein p50 wird NRIP1 ins Cytoplasma und in den Zellkern umverteilt und kann daraufhin an den N-Immunrezeptor binden (Caplan et al., 2008). NRIP1 kann wie das WHIRLY1-Protein die Plastiden verlassen. Da der Tabakmosaikvirus die Bildung von Stromuli fördert (Krenz et al., 2010), könnte man vermuten, dass NRIP1 über Stromuli von den Plastiden zum Zellkern gelangt (Caplan et al., 2008).

#### 4.1.3 Subzelluläre Lokalisation von WHIRLY3

Die subzelluläre Lokalisierung des WHIRLY3-Proteins von *A. thaliana* erfolgte durch mikroskopische Untersuchungen transgener Linien, die WHIRLY3 in Fusion mit RFP synthetisieren (3.1.4). Entsprechend der Identifizierung von WHIRLY3 als Bestandteil des TAC (Pfalz et al., 2006) ist anzunehmen, dass die punktförmigen Fluoreszenzsignale innerhalb der Chloroplasten im Mesophyll junger Blätter auf eine Lokalisation von WHIRLY3 in Nukleoiden hindeuten (3.1.4). Vergleicht man aber die WHIRLY3:RFP-Signale mit den Signalen der ebenfalls an Nukleoiden assoziierten WHIRLY1:GFP-Fusionsproteine fallen einige Unterschiede auf. Die WHIRLY3:RFP Signale sind größer und nur ein- bis fünfmal pro Plastide zu sehen, während die WHIRLY1:GFP-Signale in kleinen sowie in größeren Punkten acht- bis 15-mal in den Chloroplasten vorkommen (Abb. E7). Es wurde bereits gezeigt, dass die verschiedenen Nukleoide innerhalb einer Plastide unterschiedliche Proteine besitzen können (Melonek et al., 2010). Die unterschiedlichen WHIRLY-Signale könnten dementsprechend verschiedene Nukleoidtypen (Krupinska et al., 2012) repräsentieren.

Vergleicht man die Fluoreszenzsignale von WHIRLY3:RFP und WHIRLY1:RFP in der Epidermis, fallen weitere Unterschiede auf. Die WHIRLY1:RFP-Signale deuten auf eine Lokalisation von WHIRLY1 ausschließlich in Plastiden hin (Abb. E9A). Das WHIRLY3-Protein scheint hingegen in den Epidermiszellen sowohl in Plastiden als auch in den Mitochondrien lokalisiert zu sein (Abb. E9A, B). Auf Grund der dicht beieinander liegenden Strukturen sind mitochondriale Signale in den Mesophyllzellen allerdings schwierig zu detektieren. Zusätzlich werden schwächere Signale beim hier durchgeführten *live cell imaging* von der Epidermis und weiteren darunter liegenden Zellschichten absorbiert und sind nicht mehr sichtbar. Es könnte daher sein, dass WHIRLY3 auch in den Mesophyllzellen in Mitochondrien lokalisiert ist.

Für das WHIRLY2-Protein wurde *in vitro* ein Import sowohl in Mitochondrien als auch in Plastiden gezeigt (Krause et al., 2005). Die mikroskopischen Untersuchungen an

transgenen Linien, die WHIRLY2 in Fusion mit YFP synthetisieren, zeigten jedoch keine Lokalisation des Proteins außerhalb der Mitochondrien (Abb. E9C, D). Möglich wäre jedoch, dass sowohl WHIRLY2 als auch WHIRLY3 nur unter bestimmten entwicklungs- oder gewebespezifischen Voraussetzungen bzw. auf einen Reiz hin in der Zelle dual lokalisiert vorliegen (Abb. D2). Da WHIRLY3:RFP-Fusionsproteine in Epidermiszellen innerhalb von Stromuli detektierbar sind (Abb. E9A, B) ist es möglich, dass WHIRLY3 über Stromuli von den Plastiden zu den Mitochondrien transportiert wird. Stromuli bilden sich besonders unter Stressbedingungen wie Trockenheit oder Salzstress, welche die Bildung des Phytohormons ABA fördern (Gray et al., 2011). Der mögliche funktionelle Zusammenhang zwischen ABA und WHIRLY-Proteinen wird in Kapitel 4.3.4 diskutiert.

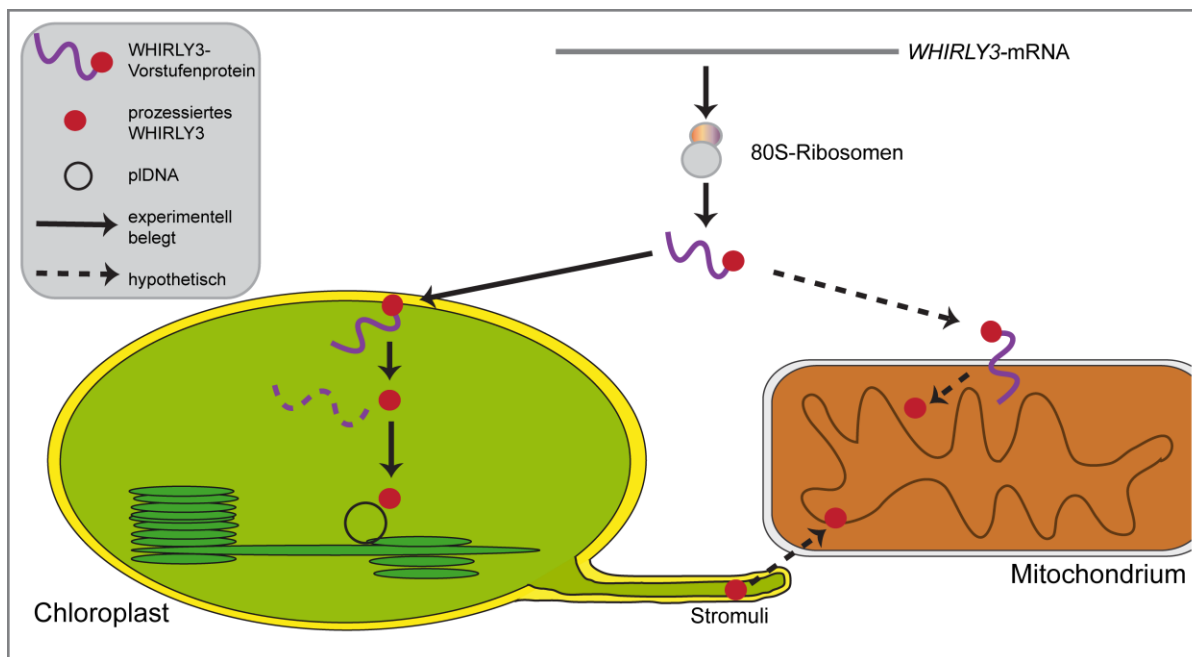


Abb. D2: Modell zur subzellulären Lokalisation von WHIRLY3. Es sind sowohl experimentell belegte als auch hypothetische Lokalisationen und Formen von WHIRLY3 dargestellt.

Immunologische Untersuchungen an Zellfraktionen mit  $\alpha$ -WHIRLY3 lieferten weitere Hinweise auf eine duale Lokalisation von WHIRLY3 in Chloroplasten und Mitochondrien (3.1.6). Mitochondrien könnten zumindest das prozessierte WHIRLY3-Protein enthalten und eventuell auch das Vorstufenprotein (Abb. E14). Zusätzlich wurde  $\alpha$ -WHIRLY3 für immunologische Untersuchungen an mikroskopischen Dünnschnitten aus Blättern von *A. thaliana* verwendet, die zeigten, dass WHIRLY3 in derselben Zelle in Mitochondrien und Plastiden vorkommt (unveröffentl. Daten M. Mulisch). WHIRLY3 scheint folglich eine duale Lokalisation in Mitochondrien und Plastiden aufzuweisen, wobei wie bei WHIRLY1 beide Isoformen aus einem Transkript entstehen (3.1.2). Welche molekularen Vorgänge der subzellulären Verteilung der beiden WHIRLY3-Isoformen in der Zelle zu Grunde liegen, bleibt noch zu klären (Abb. D2).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunologischen Analysen an Membranfraktionen aus Chloroplasten lassen vermuten, dass WHIRLY3 als Vor-

stufenprotein in der Plastidenhüllmembran akkumuliert (3.1.6) (Abb. D2). Zusätzlich deuteten auch die immunologischen Untersuchungen an mikroskopischen Dünnschnitten auf eine Lokalisation von WHIRLY3 im Bereich der plastidären Hüllmembran hin (unveröffentl. Daten M. Mulisch). Die Mengen des Vorstufenproteins und des prozessierten WHIRLY3-Proteins in Chloroplasten scheinen von der Pflanzenanzucht abhängig zu sein (3.1.6). Es bleibt noch zu klären, wie die Anzuchtbedingungen das Verhältnis von Vorstufenprotein zu prozessiertem Protein beeinflussen und ob das Verhältnis der beiden WHIRLY3-Isoformen eine physiologische Bedeutung hat. Thermolysinbehandlungen von isolierten Chloroplasten deuten darauf hin, dass das mögliche WHIRLY3-Vorstufenprotein nicht auf oder in der äußeren plastidären Hüllmembran sondern vermutlich innerhalb des Organells vorliegt (3.1.6). Dieser Befund ist unerwartet, da Vorstufenproteine üblicherweise beim Eintritt in die Plastiden prozessiert werden. Eine post-translationale Modifikation des prozessierten WHIRLY3-Proteins, die den Größenunterschied von etwa 6 kDa erklären könnte, scheint unwahrscheinlich, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob es sich bei dem 30 kDa großen Protein tatsächlich um das WHIRLY3-Vorstufenprotein handelt.

Das WHIRLY3:RFP-Fusionsprotein war nicht im Zellkern nachweisbar (3.1.4). Diese Beobachtung könnte darauf zurückgeführt werden, dass das Fusionsprotein zu groß ist, um die Kernporen passiv zu passieren (vergleiche 4.1.1). Allerdings war bei Immunmarkierungen von mikroskopischen Dünnschnitten mit  $\alpha$ -WHIRLY3 auch das endogene WHIRLY3-Protein nicht im Zellkern detektierbar (unveröffentl. Daten M. Mulisch). Es ist daher anzunehmen, dass WHIRLY3 nicht im Zellkern lokalisiert ist. Dem widerspricht, dass *in vitro* Untersuchungen zur transkriptionellen Kontrolle eines *Kinesin*-Gens von *A. thaliana* zeigten, dass WHIRLY3 an den Promotor des Gens bindet (Xiong et al., 2009). Eventuell ist WHIRLY3 nur unter bestimmten Bedingungen im Zellkern lokalisiert.

#### 4.2 Interaktionspartner des WHIRLY3-Proteins von *Arabidopsis thaliana*

Durch Einsatz des Hefe-2-Hybridsystems wurden sieben potentielle Interaktionspartner des WHIRLY3-Proteins von *A. thaliana* identifiziert (3.2.1). Entsprechend der möglichen Lokalisation des WHIRLY3-Proteins in Mitochondrien wurden drei mitochondriale Interaktionspartner, CysC1, ACO1 und ein unbekanntes Protein, gefunden (Tab. E1). CysC1 wäre auf Grund seiner Kupferbindeaktivität (García et al., 2010) ein sehr interessanter Kandidat für eine Interaktion mit WHIRLY3, für das ebenfalls eine theoretische Kupferbindedomäne ermittelt wurde (1.4.1). Die Aconitase ACO1 ist ein Enzym mit einem Fe-S-Kluster, welches die reversible Umsetzung von Citrat zu Isocitrat katalysiert. Das Enzym findet man in Mitochondrien und im Cytoplasma. Mitochondriale Aconitasen haben eine Funktion im Krebszyklus. Die Funktion der cytoplasmatischen Aconitasen ist kaum untersucht und scheint in Pflanzen und Tieren unterschiedlich zu sein (Peyret et al., 1995). Für ACO1 von



*A. thaliana* wird eine Bindung an RNA diskutiert (Arnaud et al., 2007), wie sie für WHIRLY3 durch die nahe Verwandtschaft zu dem RNA-Bindeprotein WHIRLY1 (Prikryl et al., 2008; Melonek et al., 2010) ebenfalls wahrscheinlich ist. Ein Komplex aus WHIRLY3 und ACO1 könnte an RNA binden und regulatorisch wirken.

Auf Grund der subzellulären Lokalisation von WHIRLY3 in Plastiden und Mitochondrien sollte das Protein besonders in den Organellen mit anderen Proteinen interagieren. Entgegen der Erwartungen wurden mit dem Hefe-2-Hybridsystem vier potentielle WHIRLY3-Interaktionspartner identifiziert, die außerhalb der Organellen zu finden sind. Im Hefe-2-Hybridsystem interagieren die Proteine im Zellkern der Hefezellen und es kann zu falschen Interaktionen kommen, die *in vivo* auf Grund einer räumlichen Trennung der Proteine nicht möglich sind. Es bleibt zu klären, unter welchen Bedingungen WHIRLY3 mit diesen vier Proteinen interagieren kann und ob diese Interaktionspartner eine Rolle bei einer möglichen Umverteilung von WHIRLY3 in der Zelle spielen können. Zu den potentiellen WHIRLY3-Interaktionspartnern außerhalb der Organellen gehört das L11-Protein der 60S-Ribosomen (Carroll, 2013). Proteine, die in großen Mengen in der Zelle vorkommen, wie das L11-Protein, können im Hefe-2-Hybridsystem fälschlicherweise als Interaktionspartner identifiziert werden. Auf Grund der Funktion von WHIRLY-Proteinen als RNA-Bindeproteine (Prikryl et al., 2008; Melonek et al., 2010; Janicka et al., 2012) ist dennoch auch eine Interaktion von WHIRLY3 mit einem ribosomalen Protein denkbar. Ein weiterer möglicher Interaktionspartner von WHIRLY3 ist das Enzym CER6/CUT1, welches eine entscheidende Rolle bei der Verlängerung von Fettsäuren spielt, die in Plastiden hergestellt und anschließend aus dem Organell exportiert werden (Fiebig et al., 2000; Hooker et al., 2002). CER6/CUT1 könnte an der äußeren plastidären Hüllmembran lokalisiert sein und dort mit dem möglichen Vorstufenprotein von WHIRLY3 (4.1.3) interagieren. Über die Funktion der im ER lokalisierten Xyloseisomerase, die als weiterer potentieller Interaktionspartner von WHIRLY3 identifiziert wurde, ist wenig bekannt (Dunkley et al., 2006). Schließlich wurde noch LAZ1, ein Protein mit sechs Transmembrandomänen, welches in Protoplasten im Cytoplasma, der Plasmamembran und Vesikeln lokalisiert wurde, als möglicher Interaktionspartner von WHIRLY3 identifiziert. LAZ1 ist an der Pathogenabwehr beteiligt (Malinovsky et al., 2010). Eine Interaktion mit LAZ1 weist auf eine Funktion von WHIRLY3, welches eine große Sequenzähnlichkeit zu WHIRLY1 hat, während der Pathogenabwehr hin.

Das Protein aus der Familie der Xyloseisomerasen und ACO1 wurden zuvor bereits als Kandidaten für eine Interaktion mit WHIRLY1 identifiziert (unveröffentl. Daten Y. Miao). Da WHIRLY1 und WHIRLY3 eine hohe Sequenzähnlichkeit zeigen, ist zu erwarten, dass beide Proteine mit den gleichen Partnern interagieren. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch Hinweise auf unterschiedliche Lokalisationen und Funktionen von WHIRLY1 und WHIRLY3 erhalten. Dies erklärt die mit dem Hefe-2-Hybridsystem gefundenen möglichen WHIRLY3-Interaktionspartner, die nicht mit WHIRLY1 interagieren können.

Um Interaktionspartner innerhalb der Plastiden zu identifizieren, wurde  $\alpha$ -WHIRLY3 für eine Koimmunpräzipitation mit Chloroplastenproteinen aus Blättern von *A. thaliana* verwendet. Da die Koimmunpräzipitation mit nativen Proteinen durchgeführt wird, sind auch Interaktionspartner identifizierbar, die nicht direkt mit WHIRLY3 interagieren, sondern über andere Proteine oder Nukleinsäuren mit WHIRLY3 verbunden sind (Lalonde et al., 2008). Mit Hilfe des Hefe-2-Hybridsystems waren nur direkte Protein-Interaktionen nachweisbar. Durch die Koimmunpräzipitation konnten zehn mögliche Interaktionspartner des WHIRLY3-Proteins ermittelt werden (Tab. E2), von denen im Folgenden nur diejenigen mit einem hohen score-Wert diskutiert werden (3.2.2). Es handelt sich dabei um PPR4, PRPS5, FIB1a, PTAC4/VIPP1, PetA, LHCB5/CP26 und PRPS3. PRPS5, PRPS3, PPR4 und PTAC4/VIPP1 sind wie WHIRLY3 als Bestandteile des TAC identifiziert worden (Pfalz et al., 2006; Melonek et al., 2012). PRPS5 und PRPS3 sind Bestandteile der plastidären 70S-Ribosomen und binden an RNA (Yamaguchi und Subramanian, 2000). PPR4 gehört zu den PPR-Proteinen, die in den Organellen an Nukleinsäuren binden und post-translationale Prozesse regulieren. Für PPR4 von Mais wurde gezeigt, dass es an das erste Intron im *rps12*-Transkript bindet und für die Prozessierung dieses Gruppe 2 Introns wichtig ist (Schmitz-Linneweber et al., 2006). WHIRLY1-Proteine von Mais und Gerste binden ebenfalls an die *rps12*-mRNA (Prikryl et al., 2008; Melonek et al., 2010). WHIRLY3 und PPR4 könnten während der Bindung an die *rps12*-mRNA interagieren.

Die möglichen WHIRLY3-Interaktionspartner PetA und LHCB5 sind an der Photosynthese beteiligt. PetA/Cytochrom-f ist Bestandteil des Cytochrom- $b_6f$ -Komplexes in der Thylakoidmembran (Mitchel, 1961) und LHCB5 ist ein Bestandteil des Lichtsammelkomplexes des PSII (Kühlbrandt et al., 1994; Jansson, 1999). Für WHIRLY1 wurde mittels Hefe-2-Hybrid Analysen eine Interaktion mit dem LHCA1-Protein, das ebenfalls an der Photosynthese beteiligt ist, gezeigt (unveröffentl. Daten Y. Miao). Die pDNA kodiert für essentielle Photosyntheseproteine. Daher müssen die Aktivitäten der plastidären Nukleioide genau auf die Photosynthese abgestimmt werden (Allen und Pfannschmidt, 2000). WHIRLY-Proteine könnten an dieser Abstimmung beteiligt sein. Hierbei wäre es denkbar, dass die WHIRLY-Proteine sowohl mit Photosyntheseproteinen als auch mit TAC-Proteinen bzw. Nukleinsäuren interagieren. Da Nukleioide an die Thylakoidmembran gebunden sind, könnten Veränderungen im Redoxzustand des Photosyntheseapparates auch einen Einfluss auf die Proteine im TAC haben (Schröter et al., 2010). Interessanterweise wurde WHIRLY3 als ein redoxsensitives Protein identifiziert. Das Protein beinhaltet ein Cystein, das abhängig vom Redoxzustand der Chloroplasten intermolekulare Disulfidbrücken bildet (Ströher und Dietz, 2008). Es wäre denkbar, dass die Oligomerisierung von WHIRLY3 über den Redoxzustand des Photosyntheseapparates reguliert wird und die daraus resultierenden strukturellen Veränderungen Einfluss auf die Aktivität des plastidären Nukleoids haben.

Zwei der gefundenen WHIRLY3-Interaktionspartner befinden sich in der Plastidenhüllmembran oder können mit dieser assoziiert sein. Hierbei handelt es sich um PTAC4 und FIB1a. Diese Proteine könnten mit dem möglichen WHIRLY3-

Vorstufenprotein interagieren, welches in der Hüllmembran der Plastiden zu akkumulieren scheint (4.1.3). Mutanten, in denen die Expression von *PTAC4* reduziert ist, bilden bei der Entwicklung von Chloroplasten aus Proplastiden keine Thylakoidmembranen aus, da keine Vesikel von der inneren Plastidenhüllmembran abgeschnürt werden. Daher wird das Protein auch als VIPP1 (*vesicle-inducing protein in plastids1*) bezeichnet. PTAC4/VIPP1 ist sowohl mit der inneren Hüllmembran der Plastiden als auch mit den Thylakoiden assoziiert (Kroll et al., 2001) und wie bereits beschrieben Bestandteil des TAC (Pfalz et al., 2006). Chloroplasten aus *vipp1*-Mutanten erscheinen im Elektronenmikroskop aufgebläht, da sie nicht in der Lage sind, durch osmotischen Stress beschädigte Teile der Plastidenhüllmembran zu reparieren. PTAC4/VIPP1 ist folglich besonders unter Stressbedingungen wichtig für die Integrität der Plastidenhüllmembran (Zhang et al., 2012). Das FIB1a-Protein gehört zu den 13 Fibrillin-Proteinen von *A. thaliana* (Laizet et al., 2004; Singh und McNellis, 2011). Fibrilline sind plastidäre Lipidbindepoteine, die sowohl in Plastoglobuli als auch in Thylakoidmembranen und den PS-Antennenkomplexen nachgewiesen wurden. Sie sind auch dafür bekannt, in abiotischen und biotischen Stresssituationen zu akkumulieren (Singh und McNellis, 2011, Shanmugabalaji et al., 2013). Sowohl die Menge an *FIB1a*-Transkript als auch die Menge an FIB1a-Protein werden durch Kälte, Starklicht, Trockenheit und ABA erhöht (Yang et al., 2006; Singh und McNellis, 2011).

### 4.3 Funktionen der WHIRLY-Proteine von *Arabidopsis thaliana*

#### 4.3.1 Expression von WHIRLY-Genen

Vorangegangene Studien mit Primärblättern der Gerste zeigten, dass die *HvWHIRLY1*-Transkriptmenge im Blattmeristem im Vergleich zu ausdifferenzierten Blattbereichen erhöht ist (Grabowski, 2008). Expressionsstudien im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass sowohl die *WHIRLY1*- als auch die *WHIRLY3*-Transkriptmengen in geschlossenen Blütenknospen im Vergleich zu Rosettenblättern stark erhöht sind (3.3.1.1). Das deutet darauf hin, dass auch in *A. thaliana* die Gene *WHIRLY1* und *WHIRLY3* in Organen, die viele teilungsaktive Zellen besitzen, eine starke Expression aufweisen. In anderen untersuchten Organen mit wenig teilungsaktiven Zellen (Spross, Hochblätter, geöffnete Blüten) waren die Transkriptmengen beider *WHIRLY*-Gene niedriger als in den Rosettenblättern (Abb. E17). In vier Tage alten Keimlingen war die *WHIRLY1*-Transkriptmenge sehr viel höher als in zwölf Tage alten Keimlingen, während die *WHIRLY3*-Transkriptmenge in beiden Entwicklungsstadien gleich war (Abb. E18). Dies verdeutlicht, dass die Transkription der Gene für die beiden plastidären WHIRLY-Proteine nicht immer koreguliert ist (Abb. E18). Trotz der hohen Sequenzverwandtschaft (Abb. E10) könnten WHIRLY1 und WHIRLY3 also verschiedene Funktionen übernehmen. Während der Seneszenz zeigten die Transkriptmengen der Genen *WHIRLY1* und *WHIRLY3* in Rosettenblättern keine auffälligen Veränderungen (Abb. E19).

In Gerste wurden Transkripte des *HvWHIRLY2*-Gens sowohl vermehrt im Blattmeristem als auch in seneszenten Blättern nachgewiesen (Grabowski, 2008). Im Unterschied zur Gerste war in *A. thaliana* die Transkriptmenge des *WHIRLY2*-Gens in keinem der untersuchten Organe höher als in Rosettenblättern (Abb. E17) und auch in vier und zwölf Tage alten Keimlingen etwa gleich hoch (Abb. E18). *WHIRLY2* scheint in meristematischen Zellen von *A. thaliana* daher nicht verstärkt exprimiert zu werden. Auch in seneszenten Rosettenblättern von *A. thaliana* wurde für *WHIRLY2* keine erhöhte Transkriptmenge beobachtet (Abb. E19).

#### 4.3.2 Phänotyp der *WHIRLY*-Mutanten

Die Phänotypen der *why1*-Mutanten und der transgenen Linien, die entweder die komplette *WHIRLY1*-Sequenz (pn*WHIRLY1*:HA) oder die *WHIRLY1*-Sequenz ohne die plastidäre Importsequenz überexprimieren (n*WHIRLY1*:HA), unterschieden sich weder während der Keimung noch während der späteren Entwicklung der Pflanzen vom Wildtyp (3.3.2.3). Diese Beobachtungen stimmen mit denen aus einer vorangegangenen Arbeit überein (Yoo et al., 2009). Da *WHIRLY1* und *WHIRLY3* von *A. thaliana* zu fast 80 % aus identischen Aminosäuren bestehen, ist denkbar, dass *WHIRLY3* Funktionen von *WHIRLY1* übernehmen kann. Ein Phänotyp wäre folglich nur in einer Mutante zu erwarten, der beide Proteine fehlen. Tatsächlich zeigte die Doppelmutante *why1-p x til-why3* (Maréchal et al., 2009) unter den verwendeten Anzuchtbedingungen eine leicht verzögerte Entwicklung im Vergleich zum Wildtyp (Abb. E23). An parallel angezogenen *til-why3*-Pflanzen wurde der gleiche Phänotyp beobachtet, jedoch nicht an ebenfalls untersuchten *why1-1*-Mutanten. Folglich wird angenommen, dass die verzögerte Entwicklung nur durch das Fehlen des *WHIRLY3*-Proteins verursacht wird. Dies deutet darauf hin, dass *WHIRLY1* und *WHIRLY3* nicht vollständig redundant sind und unterschiedliche Aufgaben während der Entwicklung übernehmen können. Es wäre wichtig, zusätzlich auch den Phänotyp der *why1-p*-Mutante zu untersuchen.

N. Brisson und Mitarbeiter beobachteten bei 4,6 % der *why1-p x til-why3*-Doppelmutanten variierte Blätter, die bei den beiden Einzelmutanten nicht auftraten (Maréchal et al., 2009). Somit müssen *WHIRLY1* und *WHIRLY3* auch gleiche Funktionen haben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Doppelmutante nur bei einer Anzucht mit erhöhter Lichtintensität von 180  $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$  variierte Blätter bildet. Wurden Pflanzen bei 80 bis 100  $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$  angezogen, waren keine Variegationen nachweisbar (Abb. E23). Die Lichtabhängigkeit des Phänotyps der *why1-p x til-why3*-Mutante zeigt, dass *WHIRLY1* und *WHIRLY3* besonders unter Stressbedingungen eine Bedeutung für die Chloroplastenentwicklung haben. Die Chloroplastenentwicklung in einer Gerstenmutante, die eine reduzierte Menge an *WHIRLY1*-Protein besitzt, ist erst bei kontinuierlicher Beleuchtung gestört, was sich durch weiße Primärblätter zeigt. Je höher die Lichtintensität, desto weißer sind die Blätter der Gerstenmutante (unveröffentl. Daten

K. Krupinska; 1.4.3.3). Das Auftreten von Variegationen in anderen Mutanten von *A. thaliana* ist ebenfalls von der Lichtintensität abhängig (Rosso et al., 2009). So sind 80 bis 100 % der *msh1*-Mutanten variiert, je nachdem bei welcher Lichtintensität sie angezogen wurden (Xu et al., 2011a). MSH1 ist wie WHIRLY1 und WHIRLY3 ein Protein, das in Plastiden die Rekombination der pDNA reguliert und als "Anti-Rekombinationsprotein" bezeichnet wird (1.4.3.2; Xu et al., 2011a). Fehlen MSH1 bzw. WHIRLY1 und WHIRLY3 so kommt es zur verstärkten Rekombination der pDNA, was für die Variegationen der Blätter verantwortlich gemacht wurde (Maréchal et al., 2009; Cappadocia et al., 2010; Xu et al., 2011a). Auch WHIRLY1-Mutanten von Mais haben gebleichte Blätter oder sind vollständig weiß (Prikryl et al., 2008). Hier sind jedoch alle Pflanzen betroffen, und homozygote Mutanten sind nicht lebensfähig. Interessanterweise haben die Maismutanten trotz des ausgeprägten Phänotyps nur sehr wenig rekombinierte pDNA, wohingegen die variierten *why1-p x til-why3*-Doppelmutante von *A. thaliana* viele Rekombinationen der DNA in Chloroplasten aufweisen (Maréchal et al., 2009). Der Phänotyp der Maismutante wurde auf einen geringeren Gehalt an plastidären Ribosomen zurückgeführt (Prikryl et al., 2008) und nicht wie in *A. thaliana* auf Veränderungen in der pDNA (Maréchal et al., 2009).

Die *why1-p x til-why3*-Mutante, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, besitzt lediglich eine T-DNA-Insertion im Promotor von WHIRLY1 (1.4.3.3). Zwar war bei Western Blot Analysen mit einem Antikörper, der sowohl WHIRLY1 als auch WHIRLY3 erkennt, in der *why1-p x til-why3*-Mutante kein Protein mehr detektierbar, es ist jedoch nicht auszuschließen, dass unter bestimmten Umständen kleinere oder sogar größere Mengen an WHIRLY1 in der Mutante akkumulieren. Dies würde erklären, warum der Phänotyp der *why1-p x til-why3*-Mutante von *A. thaliana* schwächer ausgeprägt ist als der Phänotyp entsprechender Mutanten von Mais oder Gerste (vergleiche Tab.1). Es ist zu erwarten, dass eine Kreuzung aus *why1-1* und *til-why3* zur Bildung weißer Blätter oder sogar zu nicht lebensfähigen Pflanzen führt.

Wodurch die Chloroplastenentwicklung in WHIRLY-Mutanten der verschiedenen Pflanzenarten gestört wird und wie die Lichtintensität dies beeinflusst, ist bisher nicht geklärt. Das Fehlen eines Bestandteils der plastidären Nukleotide könnte zur Störung der Aktivität der in Plastiden kodierten RNA-Polymerase (PEP, *plastid encoded polymerase*) zu einem frühen Zeitpunkt der Chloroplastenentwicklung führen. Aus diesem Grund sind viele Mutanten, denen ein TAC-Protein fehlt, von Beginn ihrer Entwicklung an weiß (Pfalz und Pfannschmidt, 2013).

#### 4.3.3 Einfluss der WHIRLY-Proteine auf die Wahrnehmung von Salicylsäure und Abscisinsäure während der Keimung

Durch gleichzeitige Behandlung mit SA und Abamin, einem Inhibitor der ABA-Biosynthese, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Salicylsäure die Keimung hemmt, indem sie die Synthese von ABA verstärkt (3.3.3.2). Entsprechend sind während der Keimung die beiden *why1*-Mutanten nicht nur

insensitiv gegenüber SA sondern auch gegenüber ABA (3.3.3.1). Ein Vergleich der Keimungsraten ergab, dass die *til-why3*-Mutante sensibler gegenüber ABA ist als die *why1*-Mutanten (3.3.3.6). Dagegen zeigten Samen der *why2*-Mutante bei Keimung auf ABA-haltigem Medium keinen deutlichen Unterschied zum Wildtyp (3.3.3.6). Die Doppelmutante *why1-p x til-why3* verhielt sich während der Keimung auf ABA-haltigem Medium wie die *til-why3*-Mutante (3.3.3.6). Wie bereits diskutiert (4.3.2) ist es denkbar, dass die T-DNA-Insertion im Promotor der *why1-p*-Mutante die WHIRLY1-Synthese lediglich dereguliert und die *why1-p x til-why3*-Mutante folglich noch WHIRLY1 besitzt. Auf Grund der Keimungsexperimente können lediglich die *why1*-Mutanten eindeutig der Gruppe der sogenannten *abi*-Mutanten (*aba insensitive*) zugeordnet werden, die in Gegenwart von ABA keimen können (Finkelstein, 1994; Finkelstein und Somerville, 1990).

Die Bedeutung von WHIRLY3 für die Wahrnehmung von ABA während der Keimung konnte mit Hilfe der Keimungsexperimente nicht eindeutig geklärt werden. Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen potentiellen WHIRLY3-Interaktionspartner CER6, FIB1a und LHCB5 (4.2) deuten darauf hin, dass auch WHIRLY3 für die Wahrnehmung von ABA wichtig sein könnte. So wird zum Beispiel die Expression des *CER6*-Gens durch ABA verstärkt (Hooker et al., 2002). Das Vorläuferprotein von FIB1a interagiert mit ABI2 (ABA-INSENSITIVE2) und die Genexpression von *FIB1a* wird sowohl von ABI2 als auch ABI1 beeinflusst. Gemeinsam mit ABA verstärkt FIB1a die Toleranz des PSII gegenüber der durch Starklicht induzierten Photoinhibition (Yang et al., 2006). Die Stomata einer *LHCB5*-Mutante sind insensitiv gegenüber ABA. Die Mutante akkumulierte mehr ROS, dessen Menge jedoch durch eine Behandlung mit ABA gesenkt werden konnte (Xu et al., 2011b). Sollte WHIRLY3 wie WHIRLY1 tatsächlich wichtig für die Wahrnehmung von ABA während der Keimung sein, könnte ein Heterooligomer aus den beiden plastidären WHIRLY-Proteinen eine essentielle Rolle spielen (Abb. D3).

WHIRLY1 von *A. thaliana* ist dual im Zellkern und in den Plastiden lokalisiert (4.1.1). Keimungsexperimente mit transgenen Linien, die WHIRLY1 entweder in beiden Kompartimenten (pnWHIRLY1:HA) oder nur im Zellkern (nWHIRLY1:HA) akkumulieren, zeigten, dass die plastidäre Isoform von WHIRLY1 die Empfindlichkeit von keimenden Samen gegenüber ABA erhöht (3.3.3.4). Eine ausschließliche Akkumulation von WHIRLY1 im Zellkern hat keinen Einfluss auf die Wahrnehmung von ABA.

Da nur die plastidäre Isoform von WHIRLY1 die Sensitivität von keimenden Samen gegenüber ABA erhöht, muss die Wahrnehmung von ABA unter den hier untersuchten Bedingungen in Plastiden stattfinden. Eine Wahrnehmung von ABA in Plastiden ist unerwartet, da das Phytohormon im Cytoplasma entsteht. Lediglich das ABA-Vorläufermolekül Xanthoxin entsteht innerhalb der Plastiden (Seo und Koshida, 2011). Keimungsversuche in Gegenwart von ABA und Abamin (3.3.3.5) zeigten, dass die zugegebene Abscisinsäure einen direkten Einfluss auf die Keimung hat und nicht indirekt über eine vermeintliche Synthese von endogenem ABA oder einem Vorläufermolekül wirkt (Abb. E29). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Versuchen zur

Keimung von Kressesamen unter Einfluss von Abamin erzielt (Han et al., 2004). ABA kann folglich in den Plastiden wahrgenommen werden (Abb. D3).

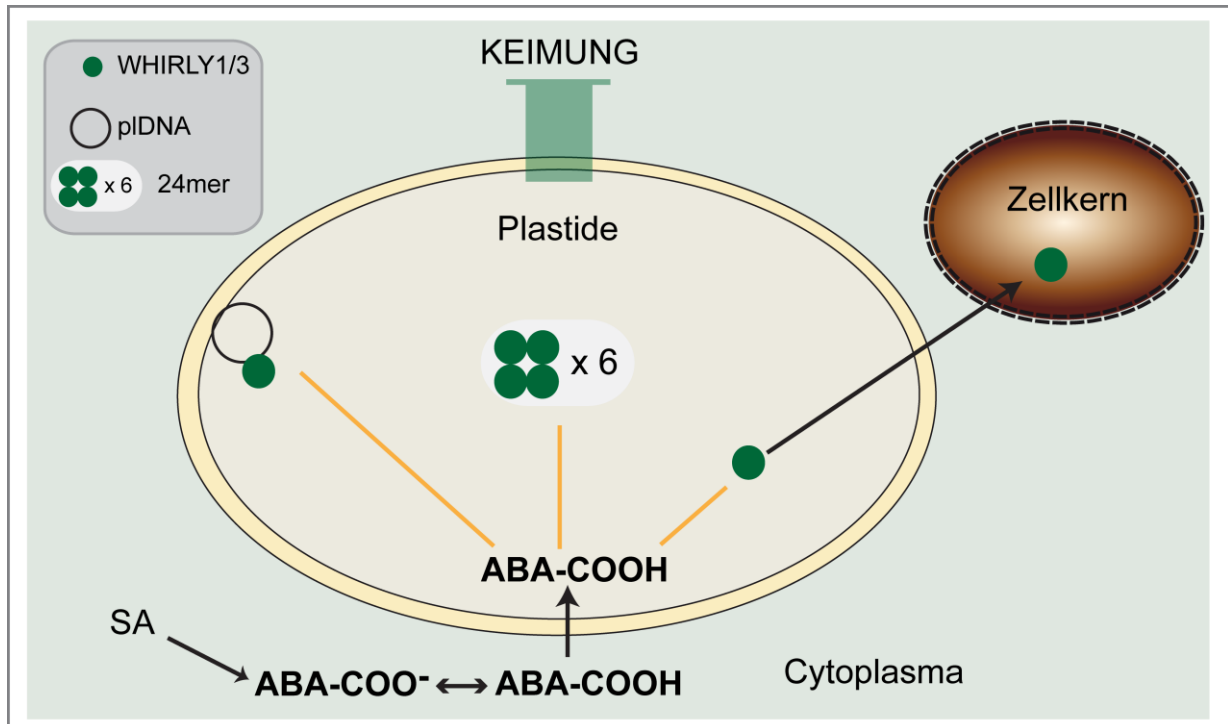


Abb. D3: Rolle der WHIRLY-Proteine bei der Wahrnehmung von Abscisinsäure (ABA) in Plastiden von *A. thaliana* während der Keimung. ABA entsteht im Cytoplasma, wobei die Synthese durch Salicylsäure (SA) verstärkt wird. In ihrer protonierten Form kann Abscisinsäure in die Plastiden gelangen, wo sie möglicherweise die Bindung von WHIRLY1/3 an pDNA, die Bildung von 24meren oder die Umverteilung in den Zellkern beeinflusst.

ABA hat ein relativ kleines Molekulargewicht und seine Cyclohexengruppe ist sehr lipophil. Weiterhin ist ABA eine schwache Säure, deren Säurekonstante  $pK$  bei 4,8 liegt. Protonierte Abscisinsäure kann im Unterschied zum Anion frei über Membranen hinweg diffundieren (Cowan et al., 1982; Seo und Koshiba, 2011). Sowohl die in den Keimungsversuchen zugegebene als auch die endogene Abscisinsäure wären also in der Lage in die Plastiden zu gelangen. Für Chloroplasten aus Spinat wurde bereits gezeigt, dass sie ABA aufnehmen und auch binden können (Raschke, 1975; Loveys, 1977; Heilmann et al., 1980; Cowan et al., 1982). Unter Verwendung radioaktiv markierter Abscisinsäure wurde gezeigt, dass bis zu 80 % der in der Zelle vorhandenen Abscisinsäure in Chloroplasten vorliegt (Loveys, 1977; Heilmann et al., 1980). Durch Röntgenkristallstrukturanalysen wurde gezeigt, dass sechs WHIRLY-Tetrameren ein 24mer bilden können, dessen Quartärstruktur einem Fass gleicht. Proteine ähnlicher Struktur können Metabolite binden (Cappadocia et al., 2012). Es könnte sein, dass die Oligomere der plastidären WHIRLY-Proteine ABA binden und hierdurch die Akkumulation in den Chloroplasten ermöglichen (Abb. D3). Eventuell wird die Abscisinsäure in den Plastiden erst wirksam, wenn sie durch WHIRLY-Proteine gebunden vorliegt oder aber ABA induziert die Bildung der WHIRLY-Oligomere. Denkbar wäre auch, dass die 24mere weitere Proteine binden, die an der

Signalübertragung beteiligt sind und so die Weitergabe des ABA-Signals in der Zelle beeinflussen (Zeke et al., 2009).

WHIRLY1 und WHIRLY3 von *A. thaliana* sind in den Plastiden Bestandteil der Nukleole. Untersuchungen an Gerstenmutanten, die weniger WHIRLY1 besitzen, zeigten, dass die Nukleole dort eine veränderte Konformation aufweisen (unveröffentl. Daten K. Krupinska). WHIRLY1 spielt folglich eine wichtige Rolle für die Struktur der Nukleole. Es wäre denkbar, dass ABA über eine Veränderung der Konformation der plastidären Nukleole die Keimung inhibiert (Abb. D3). Über plastidäre retrograde Signale könnte die strukturelle Veränderung in der pDNA an den Zellkern weiter gegeben werden, wo die für die Inhibierung der Keimung nötigen transkriptionellen Änderungen der Genexpression ausgelöst werden. Fehlt eines der plastidären WHIRLY-Proteine von *A. thaliana* kann die strukturverändernde Wirkung von ABA nicht an die Nukleole weiter gegeben werden und die Samen keimen auch in Gegenwart von ABA. Tatsächlich gibt es viele Faktoren, die die Funktionalität der Plastiden beeinflussen und so die Expression von Plastidengenen im Zellkern verändern (Leister, 2005). Plastidäre Signale kontrollieren nicht nur die Chloroplastenentwicklung während der frühen Lebensphasen der Pflanze, sondern sind auch wichtig für die Anpassung der Photosynthese an veränderliche Umweltbedingungen, denen Pflanzen ständig ausgesetzt sind (Pogson et al., 2008). Darüber hinaus beeinflussen Plastidensignale auch Prozesse, die nicht direkt die Plastiden betreffen, wie die Akkumulierung von Anthocyanen (Ruckle und Larkin, 2009), zirkadiane Vorgänge (Hassidim et al., 2007) und die Pathogenabwehr (Nomura et al., 2012). Tatsächlich scheinen Plastiden die gesamte Entwicklung einer Pflanze zu beeinflussen (Inaba und Ito-Inaba, 2010).

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass ABA eine Funktion bei der Kommunikation von Plastiden mit dem Zellkern hat und dementsprechend an der Auslösung und/oder Übertragung plastidärer retrograder Signale (1.2.1) beteiligt ist. Hierfür spricht, dass ABA als Repressor für verschiedene im Zellkern lokalisierte Photosynthesegene beschrieben wurde (Rook et al., 2006). Die Gene *RBCS* und *LHCB* werden in Blättern von Tomatenpflanzen, die mit ABA behandelt wurden, schwächer exprimiert (Bartholomew et al., 1991). Viele Gene, deren Expression durch retrograde Signale von den Plastiden reguliert wird, besitzen im Promotor *cis*-Elemente, die im Zusammenhang mit der zellulären Antwort auf ABA stehen und als ABRE (ABA responsive elements) bezeichnet werden. Oft findet man ABREs (ACGT, CGTGTC) in der Nähe von sogenannten G-box *cis*-Elementen, die für die Genexpressionskontrolle durch Licht verantwortlich sind (Rooke et al., 2006). Weitere Hinweise auf eine Funktion von ABA als plastidäres retrogrades Signal lieferte der Befund, dass eine Behandlung mit ABA zu einer teilweisen Aufhebung des negativen Effekts von Norflurazon auf die Expression von *LHCB* in Pflanzen des Wildtyps von *A. thaliana* führt (Voigt et al., 2010). Ein noch komplexeres Bild ergab sich, als GUN5, also die Untereinheit H des Enzyms Mg-Chelatase, als ABA-Rezeptor identifiziert wurde (Shen et al., 2006; Wu et al., 2009; Shang et al., 2010).



Allerdings ist diese Entdeckung umstritten (Tsuzuki et al., 2011). Der Transkriptionsfaktor ABI4 (ABA-INSENSITIVE4), der ursprünglich im Zusammenhang mit der Wahrnehmung von ABA beschrieben wurde (Finkelstein, 1994; León et al., 2012), ist an der Übertragung verschiedener retrograder Signale beteiligt. Die *ABI4*-Expression wird von GUN1 reguliert. *Abi4*-Mutanten zeigen bei Anzucht auf Lincomycin (LN) keine Reprimierung der Expression eines *LHCB*-Gens und gehören daher zu den *gun*-Mutanten (Koussevitzky et al., 2007). Eigene Keimungsexperimente mit den Mutanten *gun1-1*, *gun1-102* und *gun5*, die unter den gleichen Bedingungen wie für die *why*-Mutanten durchgeführt wurden, zeigten, dass auch diese Mutanten weniger empfindlich gegenüber ABA sind (3.3.3.3).

In anderen Untersuchungen konnte die mögliche Rolle von ABA als Plastidensignal hingegen nicht bestätigt werden. Zum Beispiel zeigte die *aba1*-Mutante, die kein ABA synthetisieren kann, keine verstärkte Expression von *LHCB* bei Anzucht auf LN (Koussevitzky et al., 2007). Diese Schlussfolgerung gilt jedoch nur für retrograde Plastidensignale, die durch LN ausgelöst werden, und nur für das *LHCB*-Gen. Weiterhin wurde in derselben Studie gezeigt, dass die *gun1*-Mutante keinen Unterschied zum Wildtyp bei Behandlung mit ABA während der Keimung zeigt (Koussevitzky et al., 2007). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren *gun*-Mutanten hingegen insensitiv gegenüber der inhibierenden Wirkung von ABA auf die Keimung (3.3.3.3). Andere Studien haben die *gun*-Mutanten ebenfalls als ABA-insensitiv beschrieben (Voigt et al., 2010) oder im Gegenteil sogar als hypersensitiv (Cottage et al., 2010). Zu bedenken ist, dass sowohl die verwendeten ABA-Mengen als auch die Anzuchtmedien, Lichtbedingungen und Dauer der Experimente die Keimung stark beeinflussen können.

#### 4.3.4 Die Beteiligung von WHIRLY1 an der Kommunikation zwischen Plastiden und dem Zellkern

Plastiden kommunizieren mit dem Zellkern über retrograde Signale, wobei jedoch ungeklärt ist, wie die Informationen zwischen den Kompartimenten ausgetauscht werden (1.2.1). Alle bisher diskutierten Überträger von Plastidensignalen, wie zum Beispiel ROS, Mg-Protoporphyrin IX oder ABA, akkumulieren nicht im Zellkern. Dual im Zellkern und den Plastiden lokalisierte Proteine hingegen sind mögliche Kandidaten für die Übertragung plastidärer Signale (1.3). WHIRLY1 ist das erste Protein, für das gezeigt wurde, dass es aus den Plastiden in den Zellkern umverteilt werden kann (3.1.3). Da sowohl die plastidäre als auch die nukleäre WHIRLY1-Isoform an DNA binden (Desveaux et al., 2000; Maréchal et al., 2009), wäre WHIRLY1 in der Lage, Informationen über den physiologischen Zustand der Plastiden an den Zellkern weiter zu leiten. Um eine mögliche Funktion von WHIRLY1 bei der Übertragung retrograder Signale zu untersuchen, wurde in *why1*-Mutanten und dem Wildtyp der Einfluss von Norflurazon (NF) auf die Expression von im Zellkern kodierten Plastidengen vergleichend analysiert (1.2.2). Durch NF wird die Carotinoidbiosynthese gestört. Dies hat zur Folge, dass neben der Chlorophyllbiosynthese auch die Synthese von ABA und anderen Stoffen, für die Carotinoide als

Vorläufermoleküle essentiell sind, unterbunden wird. Es zeigte sich, dass bei Anzucht von Keimlingen auf NF die Transkriptmenge des Gens *LHCB1.3* aber nicht die des *RBCS*-Gens in *why1*-Mutanten höher war als im Wildtyp (3.3.4.1). Die *why1*-Mutanten können folglich nur im Bezug auf das *LHCB*-Gen den *gun*-Mutanten zugeordnet werden.

Vergleicht man die Transkriptmenge von *LHCB1.3* nach Anzucht auf NF in den *why1*-Mutanten mit der in den ebenfalls untersuchten *gun*-Mutanten, fällt auf, dass die Transkriptmenge in den *gun*-Mutanten sehr viel höher ist (Abb. E31). Durch das Fehlen von WHIRLY1 wird also die Genexpression im Zellkern weniger stark von den Plastidensignalen "entkoppelt" als in den bekannten *gun*-Mutanten. Auch die *cry1*-Mutante zeigt bei Anzucht auf NF einen weniger stark ausgeprägten *gun*-Phänotyp (Ruckle et al., 2007). Einen weiteren Hinweis auf das spezifische Plastidensignal, welches von WHIRLY1 übertragen wird, wurde von den Analysen der Transkriptmengen von auf LN angezogenen Keimlingen erwartet. Es zeigte sich jedoch, dass die *why1*-Mutanten im Unterschied zu *gun1*-Mutanten keinen *gun*-Phänotyp zeigen, wenn man ihre plastidäre Proteinbiosynthese durch LN hemmt (Abb. E31).

Genau wie WHIRLY1 ist auch PRIN2 (PLASTID REDOX INSENSITIVE2) ein pflanzenspezifisches Protein, das in den Nukleoiden der Plastiden zu finden ist (Kindgren et al., 2012). Die erst kürzlich beschriebene *gun*-Mutante *prin2* besitzt auffällige Ähnlichkeiten zur *why1*-Mutante. Beide Mutanten zeigen eine veränderte Regulation der Transkriptmenge bei Anzucht auf NF, aber nicht bei Hemmung der plastidären Proteinbiosynthese. Zusätzlich sind von der veränderten Regulation spezifisch nur *LHCB*-Gene betroffen und die Expressionsänderung ist in *why1*- bzw. *prin2*-Mutanten weniger stark als in *gun1*- und *gun5*-Mutanten. Interessanterweise wird die Expression von WHIRLY1 und WHIRLY3 mit der PRIN2-Expression koreguliert. Es wurde postuliert, dass PRIN2 eine wichtige Funktion bei der Übertragung von Redox-Signalen hat, welche in Chloroplasten durch Lichtstress ausgelöst werden (Kindgren et al., 2012). Möglicherweise spielen PRIN2 und WHIRLY1 eine Rolle im gleichen Signalweg.

Um zu untersuchen, ob für die retrograde Kommunikation eine Lokalisation von WHIRLY1 im Zellkern ausreicht oder aber WHIRLY1 in Plastiden vorliegen muss, wurden die Analyse der Transkriptmenge mit den auf NF bzw. LN angezogenen Keimlingen auch für die transgenen Linien pnWHIRLY1:HA und nWHIRLY1:HA durchgeführt (3.3.4.2). Die Linie, in der WHIRLY1 im Zellkern und den Plastiden akkumuliert, zeigte bei Anzucht auf NF und LN eine ähnlich hohe *LHCB1.3*- und *RBCS*-Transkriptmenge wie der Wildtyp. In dieser Linie steht das WHIRLY1:HA-Genkonstrukt unter Kontrolle des 35S-Promotors und das rekombinante WHIRLY1-Protein akkumuliert in größeren Mengen als das endogene Protein im Wildtyp. Trotz der erhöhten Menge von WHIRLY1 ist in pnWHIRLY1:HA-Keimlingen die Transkriptmenge ähnlich wie im Wildtyp. Somit ist nicht die Menge von WHIRLY1 sondern allein das Vorhandensein des Proteins für die Übertragung des Plastidensignals bedeutsam.

In der Linie, die WHIRLY1 ohne die plastidäre Importsequenz synthetisiert, war die *LHCB1.3*-Transkriptmenge bei Anzucht auf Medium mit NF höher als im Wildtyp ähnlich wie in der *why1-1*-Mutante, welche als genetischer Hintergrund für die Herstellung von nWHIRLY1:HA verwendet wurde (Abb. E32). Eine Akkumulation von WHIRLY1 im Zellkern reicht also nicht aus, um die Mutante *why1-1* zu komplementieren. Dies weist darauf hin, dass die Umverteilung von WHIRLY1 aus den Plastiden in den Zellkern wichtig für die retrograde Kommunikation ist. Erst wenn das WHIRLY1-Protein in der Lage ist, auch in die Plastiden zu gelangen, wie es in der pnWHIRLY1:HA-Linie der Fall ist, verhält sich die Genexpression wie im Wildtyp. Denkbar wäre, dass WHIRLY1 beim Verlassen der Plastiden als Transportbehältnis für ein Signal dient. Ob die Umverteilung von WHIRLY1 aus Plastiden in den Zellkern nur dann passiert, wenn ein Plastidensignal übertragen werden soll, bleibt fraglich. Die Umverteilung von WHIRLY1 konnte in den Plastomtransformanten unter Standardbedingungen beobachtet werden (3.1.3). Auch die duale Lokalisation von WHIRLY1, die durch die Umverteilung erreicht wird, war in Gerste und *A. thaliana* unter Standardbedingungen nachweisbar (Grabowski et al., 2008; 3.1.1). Es bleibt fraglich, wie, wann und zu welchem Zweck WHIRLY1 aus den Plastiden in den Zellkern transportiert wird und wie dies die Genexpression beeinflusst.

### 4.4 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das WHIRLY1-Protein aus den Plastiden in den Zellkern umverteilt wird. Wie WHIRLY1 aus den Plastiden gelangt, muss jedoch noch untersucht werden. Mit den Plastomtransformanten, die das rekombinante WHIRLY1:HA-Protein innerhalb der Plastiden synthetisieren, kann der Export unabhängig vom Import in die Plastiden untersucht werden. Durch biochemische Analysen an isolierten Plastidenhüllmembranen der Plastomtransformanten könnte zunächst gezeigt werden, ob das rekombinante WHIRLY1:HA-Protein mit der Membran interagiert. Eine Behandlung mit DNase bzw. RNase könnte zeigen, ob die Interaktion von WHIRLY1 mit der Membran von einer Bindung an Nukleinsäuren abhängig ist. Eine mögliche Interaktion von WHIRLY1 mit dem TIC-TOC-System oder auch mit anderen unbekannten Interaktionspartnern könnte mittels Koimmunpräzipitation mit einem HA-Tag-Antikörper gezeigt werden. Wie wichtig die DNA-Bindung bzw. die Bildung von 24meren für den Export aus den Plastiden ist, könnte getestet werden, indem Plastomtransformanten hergestellt werden, die WHIRLY1 ohne DNA-Bindedomäne bzw. ohne das für die 24mer-Bildung wichtige Lysin in den Plastiden synthetisieren.

Der Auslöser für die Umverteilung von WHIRLY1 in den Zellkern ist unbekannt. Um diesen zu ermitteln, könnte man die Plastomtransformanten mit verschiedenen möglichen Auslösern, wie ABA oder Starklicht, behandeln und anschließend die Menge an rekombinantem WHIRLY1:HA im Zellkern detektieren.

Das WHIRLY3-Protein von *A. thaliana* scheint neben seiner Lokalisation in Plastiden auch in Mitochondrien lokalisiert zu sein. Um diese Hypothese zu prüfen, sollten

weitere Analysen mit  $\alpha$ -WHIRLY3 an isolierten Mitochondrienfraktionen durchgeführt werden. Zusätzlich könnten die stabilen WHIRLY3:RFP-Linien mit der WHIRLY2:YFP-Linie gekreuzt werden, um so eine Koloalisation der beiden Proteine in Mitochondrien zu zeigen.

In Plastiden wurde mit  $\alpha$ -WHIRLY3 ein 30 kDa großes Protein identifiziert, bei dem es sich entweder um das WHIRLY3-Vorstufenprotein oder eine modifizierte Form von WHIRLY3 handeln könnte. Um zu klären, um welches Protein es sich handelt, sollten massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt werden. Zusätzlich könnte durch biochemische Analysen an Plastidenfraktionen aus Blättern von verschiedenen angezogenen bzw. behandelten Pflanzen ermittelt werden, unter welchen Bedingungen das 30 kDa große Protein gebildet wird.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen möglichen Interaktionspartner des WHIRLY3-Proteins sollten durch weitere Koimmunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern bestätigt werden.

Die Keimungsversuche deuten darauf hin, dass die plastidäre Isoform von WHIRLY1 für die Wahrnehmung von ABA während der Keimung erforderlich ist. Um zu testen, ob die Bildung von 24meren für die ABA-Wahrnehmung wichtig ist, könnten die Keimungsversuche mit einer Mutante durchgeführt werden, die das WHIRLY1-Protein ohne das für die Oligomerisierung der Tetramere wichtige Lysin synthetisiert. Um zu testen, ob WHIRLY1 ABA bindet, könnten *in vitro* ABA-Bindeassays mit rekombinantem WHIRLY1-Protein durchgeführt werden.

Um die mögliche Funktion von WHIRLY1 während der Übertragung plastidärer retrograder Signale weiter zu untersuchen, sollten die *why1*-Mutanten mit bekannten *gun*-Mutanten gekreuzt und die Genexpression nach Behandlung mit NF, LN oder anderen Auslösern für Plastidensignale untersucht werden.

### 5. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der Arbeit stehen die Lokalisation und die Funktionen der Proteine WHIRLY1 und WHIRLY3 von *Arabidopsis thaliana*. Immunologisch konnte gezeigt werden, dass WHIRLY1 dual in den Plastiden und im Zellkern lokalisiert ist. Ein rekombinantes WHIRLY1-Protein mit einem HA-Tag, welches in Plastomtransformatanten des Tabaks in den Plastiden synthetisiert wurde, ist auch im Zellkern nachweisbar. Die vorliegende Arbeit zeigt somit am Beispiel von WHIRLY1 zum ersten Mal, dass eine Umverteilung von Proteinen aus den Plastiden in den Zellkern möglich ist. Neben WHIRLY1 besitzt *A. thaliana* mit WHIRLY3 ein zweites plastidäres WHIRLY-Protein, das mit den Nukleoiden assoziiert ist. Entsprechende GFP- bzw. RFP-Fusionsproteine sind daher punktförmig in den Chloroplasten verteilt. Die Detektion der WHIRLY3:RFP-Fusionsproteine deutete auf eine zusätzliche Lokalisation von WHIRLY3 in den Mitochondrien hin. Die duale Lokalisation in Plastiden und Mitochondrien konnte an Zellfraktionen mit einem Antikörper gegen WHIRLY3 immunologisch bestätigt werden. Die immunologischen Untersuchungen zeigten außerdem, dass in Chloroplasten neben der prozessierten Form von WHIRLY3, die ein Molekulargewicht von etwa 24 kDa hat, noch ein Protein mit einer Größe von etwa 30 kDa vorliegt. Das größere Protein ist spezifisch in Membranfraktionen von Chloroplasten nachweisbar und könnte daher das WHIRLY3-Vorstufenprotein sein. Mögliche Interaktionspartner, welche mittels Hefe-2-Hybridsystem und Koimmunpräzipitation ermittelt wurden, deuten auf eine Assoziation von WHIRLY3 mit TAC-Proteinen und Photosyntheseproteinen und auf eine zusätzliche Lokalisation des Proteins in den Mitochondrien hin. Quantitative *Real-Time* PCR Analysen zeigten, dass die nahe verwandten Gene *WHIRLY1* und *WHIRLY3* beide verstärkt in teilungsaktiven Organen exprimiert werden. In Blättern von Keimlingen wird hingegen nur *WHIRLY1* entwicklungsabhängig exprimiert. Eine Doppelmutante, die gleichzeitig Mutationen in den Genen *WHIRLY1* und *WHIRLY3* besitzt, zeigte bei Anzucht unter höheren Lichtintensitäten eine gestörte Entwicklung der Chloroplasten. Vorangegangene Arbeiten deuteten auf einen Zusammenhang zwischen den WHIRLY-Proteinen und Salicylsäure hin. Untersuchungen zur Keimung ergaben, dass Samen von *why1*-Mutanten sowohl unempfindlich gegenüber Salicylsäure als auch gegenüber Abscisinsäure sind. Mit einem Hemmstoff konnte gezeigt werden, dass Salicylsäure die Keimung inhibiert, indem sie die Synthese von Abscisinsäure fördert. WHIRLY1 ist also wichtig für die Wahrnehmung von Salicylsäure und Abscisinsäure während der Keimung. Untersuchungen mit transgenen Linien, in denen das WHIRLY1-Protein entweder in Plastiden und dem Zellkern oder nur im Zellkern akkumuliert, zeigten, dass spezifisch die plastidäre Form von WHIRLY1 die Empfindlichkeit von Samen gegenüber Abscisinsäure erhöht. WHIRLY1 ist daher an der Wahrnehmung von Abscisinsäure in Plastiden beteiligt. Das WHIRLY1-Protein wird als Kandidat für die Übertragung von Plastidensignalen zum Zellkern diskutiert. Durch Behandlung von Keimlingen mit Norflurazon bzw. Lincomycin wurde gezeigt, dass WHIRLY1 unter

bestimmten Bedingungen an der Übertragung retrograder Signale, die die Expression des *LHCB1.3*-Gens regulieren, beteiligt ist.

## 5. Summary

This study focuses on the localization and functions of the WHIRLY1 and WHIRLY3 proteins from *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*, L.). It was shown that WHIRLY1 is dually located to plastids and the nucleus. A recombinant WHIRLY1 protein, which was synthesized inside the plastids of transplastomic tobacco plants, is also detectable in the nucleus. Hence, WHIRLY1 is the first protein that was shown to be redistributed from plastids to the nucleus.

In addition to WHIRLY1, *A. thaliana* has a second plastid WHIRLY protein named WHIRLY3. Both proteins are associated with nucleoids. Accordingly, GFP- and RFP-fusion proteins can be found in spots inside chloroplasts. Detection of WHIRLY3:RFP fusion proteins additionally pointed towards a mitochondrial localization. Immunological studies on cell fractions using an antibody directed against WHIRLY3 confirmed its dual localization in plastids and mitochondria. Furthermore, immunological studies indicated that in addition to the mature form of WHIRLY3 having a size of about 24 kDa a bigger protein with a size of 30 kDa is detectable in chloroplasts. Since the bigger protein was detected in plastid membrane fractions, it might represent the precursor of WHIRLY3. Potential interaction partners that were identified by yeast-2-hybrid system and co-immunoprecipitation showed that WHIRLY3 is associated with proteins from nucleoids as well as with proteins involved in photosynthesis and point towards an additional localization of WHIRLY3 to mitochondria. Quantitative Real-Time PCR analyses indicated that expression of both of the closely related genes *WHIRLY1* and *WHIRLY3* is elevated in organs having a high cell division rate. However, in leaves of seedlings only *WHIRLY1* is expressed in a development-dependent way. Plants having mutations in the genes *WHIRLY1* and *WHIRLY3* show disturbed chloroplast development when grown under elevated light intensities.

Previous studies indicated a connection between WHIRLY proteins and salicylic acid. Germination assays showed that *why1* mutants are less sensitive towards salicylic acid as well as abscisic acid. It was shown that salicylic acid inhibits germination by promoting the synthesis of abscisic acid. Accordingly, WHIRLY1 is crucial for salicylic acid and abscisic acid perception during germination. Experiments with transgenic lines, that accumulate WHIRLY1 in plastids and the nucleus or in the nucleus alone, indicate that it is the plastid located isoform of WHIRLY1 which enhances the responsiveness of seeds towards abscisic acid. Hence, WHIRLY1 is important for perception of abscisic acid inside plastids. The WHIRLY1 protein has been discussed as a transmitter of signals from plastids to the nucleus. By means of treating seedlings with norflurazon and lincomycin, respectively, it was shown that under certain conditions WHIRLY1 can indeed transmit plastid retrograde signals which regulate the expression of the *LHCB1.3* gene.

## 6. Literaturverzeichnis

- Allen, J. F.**, Pfannschmidt, T. (2000) Balancing the two photosystems: photosynthetic electron transfer governs transcription of reaction centre genes in chloroplasts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355, 1351-1359.
- Andrade-Navarro, M. A.**, Sanchez-Pulido, L., McBride, H. M. (2009) Mitochondrial vesicles: an ancient process providing new links to peroxisomes. *Curr Opin Cell Biol.* 21, 560-567.
- Apel, K.**, Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 55, 373-399.
- Arnaud, N.**, Ravet, K., Borlotti, A., Touraine, B., Boucherez, J., Fizames, C., Briat, J. F., Cellier, F., Gaymard, F. (2007) The iron-responsive element (IRE)/iron-regulatory protein 1 (IRP1)-cytosolic aconitase iron-regulatory switch does not operate in plants. *Biochem J.* 405, 523-531.
- Aronsson, H.**, Jarvis, R. P. (2011) "Rapid isolation of Arabidopsis chloroplasts and their use for in vitro protein import assays," in *Chloroplast Research in Arabidopsis: Methods and Protocols*, Vol I, ed. R. P. Jarvis (Springer Science+Business Media), 281-305.
- Augustin, S.**, Nolden, M., Müller, S., Hardt, O., Arnold, I., Langer, T. (2005) Characterization of peptides released from mitochondria: evidence for constant proteolysis and peptide efflux. *J Biol Chem.* 28, 42691-42699.
- Baerenfaller, K.**, Grossmann, J., Grobei, M. A., Hull, R., Hirsch-Hoffmann, M., Yalovsky, S., Zimmermann, P., Grossniklaus, U., Gruissem, W., Baginsky, S. (2008) Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis thaliana* gene models and proteome dynamics. *Science.* 320, 938-941.
- Bartholomew, D. M.**, Bartley, G. E., Scolnik, P. A. (1991) Absciscic acid control of *rbcS* and *cab* transcription in tomato leaves. *Plant Physiol.* 96, 291-296.
- Beck, C. F.** (2001) Signaling pathways in chloroplast-to-nucleus communication. *Protist.* 152, 175-182.
- Beck, C. F.** (2005) Signaling pathways from the chloroplast to the nucleus. *Planta.* 222, 743-756.
- Birnboim, H. C.**, Doly, J. (1979) A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc Acid Res.* 7, 1513-1523.
- Bloom, G. S.**, Endow, S. A. (1995) Motor proteins 1: kinesins. *Protein Profile.* 2, 1105-1171.
- Bol, J. F.**, Linthorst, H. J. M., Cornelissen, B. J. C. (1990) Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Anna Rev Phytopathol.* 28, 113-138.
- Boyle, B.**, Brisson, N. (2001) Repression of the defense gene *PR-10a* by the single-stranded DNA binding protein SEBF. *Plant Cell.* 13, 2525-2537.
- Bouvier, F.**, Mialoundama, A. S., Camara, B. (2009) "A sentinel role for plastids," in *The Chloroplast*, ed. A. S. Sandelius, H. Aronsson (Berlin Heidelberg: Springer), 267-292.
- Bradbeer, J. W.**, Atkinson, Y. E., Börner, T., Hagemann, R. (1979) Cytoplasmic synthesis of plastid polypeptides may be controlled by plastid-synthesized RNA. *Nature.* 279, 816-817.
- Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.
- Burak, E.**, Yogev, O., Sheffer, S., Schueler-Furman, O., Pines, O. (2013) Evolving dual targeting of a prokaryotic protein in yeast. *Mol Biol Evol.* 30, 1563-1573.
- Burén, S.**, Ortega-Villasante, C., Blanco-Rivero, A., Martínez-Bernardini, A., Shutova, T., Shevela, D., Messinger, J., Bako, L., Villarejo, A., Samuelsson, G. (2011) Importance of post-translational modifications for functionality of a chloroplast-localized carbonic anhydrase (CAH1) in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One.* 6, doi: 10.1371/journal.pone.0021021.
- Busk, P. K.**, Pagès, M. (1997) Microextraction of nuclear proteins from single maize embryos. *Plant Mol Biol Rep.* 15, 371-376.
- Cao, F. Y.**, Yoshioka, K., Desveaux, D. (2011) The roles of ABA in plant-pathogen interactions. *J Plant Res.* 124, 489-499.
- Caplan, J. L.**, Mamillapalli, P., Burch-Smith, T. M., Czymmek, K., Dinesh-Kumar, S. P. (2008) Chloroplastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector. *Cell.* 132, 449-462.
- Cappadocia, L.**, Sygusch, J., Brisson, N. (2008) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the Whirly domain of StWhy2 in complex with single-stranded DNA. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 64, 1056-1059.
- Cappadocia, L.**, Maréchal, A., Parent, J. S., Lepage, E., Sygusch, J., Brisson, N. (2010) Crystal structures of DNA-Whirly complexes and their role in Arabidopsis organelle genome repair. *Plant Cell.* 22, 1849-1867.



- Cappadocia, L.**, Parent, J. S., Zampini, E., Lepage, E., Sygusch, J., Brisson, N. (2012) A conserved lysine residue of plant Whirly proteins is necessary for higher order protein assembly and protection against DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 40, 258-69.
- Carrie, C.**, Small, I. (2013) A reevaluation of dual-targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta.* 1833, 253-259.
- Carroll, A. J.** (2013) The Arabidopsis cytosolic ribosomal proteome: from form to function. *Front Plant Sci.* 4, doi: 10.3389/fpls.2013.00032.
- Chen, M.**, Galvao, R. M., Li, M., Burger, B., Bugea, J., Bolado, J., Chory, J. (2010) Arabidopsis HEMERA/pTAC12 initiates photomorphogenesis by phytochromes. *Cell.* 141, 1230-1240.
- Chiba, A.**, Ishida, H., Nishizawa, N. K., Makino, A., Mae, T. (2003) Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiol.* 44, 914-921.
- Choy, M. K.**, Sullivan, J. A., Theobald, J. C., Davies, W. J., Gray, J. C. (2008) An Arabidopsis mutant able to green after extended dark periods shows decreased transcripts of seed protein genes and altered sensitivity to abscisic acid. *J Exp Bot.* 59, 3869-3884.
- Clough, S. J.**, Bent, A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743.
- Cohen, S. N.**, Chang, A. C. Y., Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor-DNA. *PNAS.* 69, 2110-2114.
- Cottage, A.**, Mott, E. K., Kempster, J. A., Gray, J. C. (2010) The Arabidopsis plastid-signalling mutant *gun1* (*genomes uncoupled1*) shows altered sensitivity to sucrose and abscisic acid and alterations in early seedling development. *J Exp Bot.* 61, 3773-3786.
- Cowan, I. R.**, Raven, J. A., Hartung, W., Farquhar, G. D. (1982) A possible role for abscisic acid in coupling stomatal conductance and photosynthetic carbon metabolism in leaves. *Aust J Plant Physiol.* 9, 489-498.
- Cutler, S. R.**, Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., Abrams, S. R. (2010) "Abscisic acid: emergence of a core signaling network," in *Annual Review of Plant Biology*, Vol 61, ed. S. Merchant, W. R. Briggs, D. Ort, 651-679.
- Creissen, G.**, Reynolds, H., Xue, Y., Mullineaux, P. (1995) Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J.* 8, 167-175.
- Dähnhardt, D.** (2003). Untersuchungen zur Regulation der seneszenzabhängig exprimierten Gene *hpd* und *HvS40* der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und subzelluläre Lokalisierung des HvS40-Proteins. Dissertation, Kiel.
- Després, C.**, Subramaniam, R., Matton, D. P., Brisson, N. (1995) The activation of the potato *PR-10a* gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBFI. *Plant Cell.* 7, 589-598.
- Desveaux, D.**, Després, C., Joyeux, A., Subramaniam, R., Brisson, N. (2000) PBF-2 is a novel single-stranded DNA binding factor implicated in *PR-10a* gene activation in potato. *Plant Cell.* 12, 1477-1489.
- Desveaux, D.**, Allard, J., Brisson, N., Sygusch, J. (2002) A new family of plant transcription factors displays a novel ssDNA-binding surface. *Nat Struct Biol.* 7, 512-517.
- Desveaux, D.**, Subramaniam, R., Després, C., Mess, J., Lévesque, C., Fobert, P., Dangl, J. (2004) A "Whirly" transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in Arabidopsis. *Dev Cell.* 6, 229-240.
- Desveaux, D.**, Maréchal, A., Brisson, N. (2005) Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. *Trends Plant Sci.* 10, 95-102.
- Duchêne, A. M.**, Giritch, A., Hoffmann, B., Cognat, V., Lancelin, D., Peeters, N. M., Zaepfel, M., Maréchal-Drouard, L., Small, I. D. (2005) Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS.* 102, 16484-16489.
- Duchêne, A. M.**, Giegé, P. (2012) Dual localized mitochondrial and nuclear proteins as gene expression regulators in plants? *Front Plant Sci.* 3, doi: 10.3389/fpls.2012.00283.
- Dunkley, T. P.**, Hester, S., Shadforth, I. P., Runions, J., Weimar, T., Hanton, S. L., Griffin, J. L., Besant, C., Brandizzi, F., Hawes, C., Watson, R. B., Dupree, P., Lilley, K. S. (2006) Mapping the Arabidopsis organelle proteome. *PNAS.* 103, 6518-6523.
- Duttweiler, H. M.** (1996) A highly sensitive and non-lethal  $\beta$ -galactosidase plate assay for yeast. *TIG.* 12, 340-341.
- Eckhardt, U.**, Grimm, B., Hörtensteiner, S. (2004) Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Mol Biol.* 56, 1-14.
- Eckardt, N. A.** (2008) Arabidopsis synaptotagmin1 maintains plasma membrane integrity. *Plant Cell.* 20, 3182.

- Estavillo, G. M.**, Crisp, P. A., Pornsiriwong, W., Wirtz, M., Collinge, D., Carrie, C., Giraud, E., Whelan, J., David, P., Javot, H., Brearley, C., Hell, R., Marin, E., Pogson, B. J. (2011) Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and highlight signalling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 23, 3992–4012.
- Fiebig, A.**, Mayfield, J. A., Miley, N. L., Chau, S., Fischer, R. L., Preuss, D. (2000) Alterations in *CER6*, a gene identical to *CUT1*, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *Plant Cell*. 12, 2001–2008.
- Fields, S.**, Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*. 340, 245–246.
- Finkelstein, R. R.**, Somerville, C. R. (1990) Three classes of abscisic acid (ABA)-insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of ABA responses. *Plant Physiol*. 94, 1172–1179.
- Finkelstein, R. R.** (1994) Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J*. 5, 765–771.
- Finkelstein, R. R.**, Wang, M. L., Lynch, T. J., Rao, S., Goodman, H. M. (1998) The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell*. 10, 1043–1054.
- Fling, S. P.**, Gregerson, D. S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem*. 155, 83–88.
- Flores-Pérez, Ú.**, Jarvis, P. (2013) Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta*. 1833, 332–340.
- Fulton, T. M.**, Chunwongse, J., Tanksley, S. D. (1995) Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol Biol Rep*. 13, 207–209.
- Gabriel, K.**, Pfanner, N. (2007) The mitochondrial machinery for import of precursor proteins. *Methods Mol Biol*. 390, 99–117.
- Galichet, A.**, Hoyerova, K., Kaminek, M., Gruissem, W. (2008) Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 146, 1155–1164.
- García, I.**, Castellano, J. M., Vioque, B., Solano, R., Gotor, C., Romero, L. C. (2010) Mitochondrial  $\beta$ -cyanoalanine synthase is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 22, 3268–3279.
- Gogarten, P. J.**, Doolittle, W. F., Lawrence, J. G. (2002) Prokaryotic evolution in light of lateral gene transfer. *Mol Biol Evol*. 19, 2226–2238.
- Goksøyr, J.** (1967) Evolution of eucaryotic cells. *Nature*. 214, 1161.
- Gonzalez-Lamothe, R.**, Boyle, P., Dulude, A., Roy, V., Lezin-Doumbou, C., Kaur, G. S., Bouarab, K., Després, C., Brisson, N. (2008) The transcriptional activator Pti4 is required for the recruitment of a repressosome nucleated by repressor SEBF at the potato *PR-10a* gene. *Plant Cell*. 20, 3136–3147.
- Gorlich, D.** (1998) Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J*. 17, 2721–2727.
- Grabe, N.** (2007) Untersuchungen zur subzellulären Verteilung der Whirly-Transkriptionsfaktoren in höheren Pflanzen. Diplomarbeit, Kiel
- Grabowski, E.**, Miao, Y., Mulisch, M., Krupinska, K. (2008) Single-stranded DNA-binding protein Whirly1 in barley leaves is located in plastids and the nucleus of the same cell. *Plant Physiol*. 147, 1800–1804.
- Grabowski, E.** (2008) Isolierung, Charakterisierung und funktionelle Analyse der Whirly-Proteine der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation, Kiel
- Gray, J. C.**, Sornarajah, R., Zabron, A. A., Duckett, C. M., Khan, M. S. (1995) Chloroplast control of nuclear gene expression. In *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Vol. 3, ed. Mathis, P. (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), 543–550.
- Gray, M. W.**, Burger, G., Lang, B. F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science*. 283, 1476–1481.
- Gray, J. C.**, Sullivan, J. A., Wang, J. H., Jerome, C. A., MacLean, D. (2003) Coordination of plastid and nuclear gene expression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 358, 135–145.
- Gray, J. C.**, Hansen, M. R., Shaw, D. J., Graham, K., Dale, R., Smallman, P., Natesan, S. K., Newell, C. A. (2011) Plastid stromules are induced by stress treatments acting through abscisic acid. *Plant J*. 69, 387–398.
- Gruissem, W.**, Greenberg, B. M., Zurawski, G., Hallick, R. B. (1986). Chloroplast gene expression and promoter identification in chloroplast extracts. *Meth Enzym*. 118, 253–270.
- Gunning, B. E.** (2005) Plastid stromules: video microscopy of their outgrowth, retraction, tensioning, anchoring, branching, bridging, and tip-shedding. *Protoplasma*. 225, 33–42.

- Han, S.-Y.**, Kitahata, N., Sekimata, K., Saito, T., Kobayashi, M., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Yoshida, S., Asami, T. (2004) A novel inhibitor of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in abscisic acid biosynthesis in higher plants. *Plant Physiol.* 135, 1574-1582.
- Hassidim, M.**, Yakir, E., Fradkin, D., Hilman, D., Kron, I., Keren, N., Harir, Y., Yerushalmi, S., Green, R. M. (2007) Mutations in CHLOROPLAST RNA BINDING provide evidence for the involvement of the chloroplast in the regulation of the circadian clock in Arabidopsis. *Plant J.* 51, 551-562.
- Heilmann, B.**, Hartung, W., Gimmler, H. (1980) The distribution of abscisic acid between chloroplasts and cytoplasm of leaf cells and the permeability of the chloroplast envelope for abscisic acid. *Z Pflanzenphysiol.* 96, 67-78.
- Holzapfel, B.**, Wickert, L. (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *BiuZ.* 37, 120-126.
- Hooker, T. S.**, Millar, A. A., Kunst, L. (2002) Significance of the expression of the CER6 condensing enzyme for cuticular wax production in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 129, 1568-1580.
- Huang, X.-Y.**, Niu, J., Sun, M.-X., Zhu, J., Gao, J.-F., Yang, J., Zhou, Q., Yang, Z.-N. (2013) CYCLIN-DEPENDENT KINASE G1 is associated with the spliceosome to regulate CALLOSE SYNTHASE5 splicing and pollen wall formation in Arabidopsis. *Plant Cell.* 25, 637-648.
- Hundertmark, M.**, Hinch, D. K. (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics.* 9, doi: 10.1186/1471-2164-9-118.
- Hwang, H.-H.**, Gelvin, S. B. (2004) Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *Plant Cell.* 16, 3148-3167.
- Inaba, T.**, Ito-Inaba, Y. (2010) Versatile roles of plastids in plant growth and development. *Plant Cell Physiol.* 51, 1847-1853.
- Isemer, R.**, Mulisch, M., Schäfer, A., Kirchner, S., Koop, H.-U., Krupinska, K. (2012a) Recombinant Whirly1 translocates from transplastomic chloroplasts to the nucleus. *FEBS Lett.* 586, 85-88.
- Isemer, R.**, Krause, K., Grabe, N., Kitahata, N., Asami, T., Krupinska, K. (2012b) Plastid located WHIRLY1 enhances the responsiveness of Arabidopsis seedlings toward abscisic acid. *Front Plant Sci.* 3, doi: 10.3389/fpls.2012.00283.
- Janicka, S.**, Kühn, K., Le Ret, M., Bonnard, G., Imbault, P., Augustyniak, H., Gualberto, J. M. (2012) A RAD52-like single-stranded DNA binding protein affects mitochondrial DNA repair by recombination. *Plant J.* 72, 423-435.
- Jansson, S.** (1999) A guide to the *Lhc* genes and their relatives in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 4, 236-240.
- Jarvis, P.**, Soll, J. (2002) Toc, tic, and chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta.* 1590, 177-189.
- Kanazawa, A.**, O'dell, M., Hellens, R. P., Hitchin, E., Metzlaff, M. (2000). Mini-scale method for nuclear run-on transcription assay in plants. *Plant Mol Biol Rep.* 18, 377-383.
- Karimi, M.**, Inzé, D., Depicker, A. (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7, 193-195.
- Kessler, F.** (2012) Chloroplast delivery by UPS. *Science.* 338, 622-623.
- Kilbienski, I.** (2007). Untersuchungen zur Funktion und Regulation des seneszenzassoziierten *HvS40*-Genes der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und *HvS40* verwandter Gene von *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Kiel.
- Kim, C.**, Meskauskiene, R., Zhang, S., Lee, K. P., Lakshmanan Ashok, M., Blajacka, K., Herrfurth, C., Feussner, I., Apel, K. (2012) Chloroplasts of Arabidopsis are the source and a primary target of a plant-specific programmed cell death signaling pathway. *Plant Cell.* 24, 3026-3039.
- Kindgren, P.**, Kremnev, D., Blanco, N. E., de Dios Barajas López, J., Fernández, A. P., Tellgren-Roth, C., Kleine, T., Small, I., Strand, A. (2012) The plastid redox insensitive 2 mutant of Arabidopsis is impaired in PEP activity and high light-dependent plastid redox signalling to the nucleus. *Plant J.* 70, 279-291.
- Knox, C.**, Sass, E., Neupert, W., Pines, O. (1998) Import into mitochondria, folding and retrograde movement of fumarate hydratase in yeast. *J Biol Chem.* 273, 25587-25593.
- Kodama, Y.**, Sano, H. (2007) Evolution of a basic helix-loop-helix protein from a transcriptional repressor to a plastid-resident regulatory factor: involvement in hypersensitive cell death in tobacco plants. *J of Biol Chem.* 281, 35369-35380.
- Köhler, R. H.**, Cao, J., Zipfel, W. R., Webb, W. W., Hanson, M. R. (1997) Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. *Science.* 276, 2039-2042.
- Köhler, R. H.**, Hanson, M. R. (2000) Plastid tubules of higher plants are tissue-specific and developmentally regulated. *J Cell Sci.* 113, 81-89.
- Koncz, C.**, Schell, J. (1986) The promoter of T-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet.* 204, 383-396.

- Koussevitzky, S.**, Nott, A., Mockler, T. C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R., Chory, J. (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science*. 316, 715-719.
- Krause, K.**, Kilbiński, I., Mulisch, M., Rödiger, A., Schäfer, A., Krupinska, K. (2005) DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles. *FEBS Lett.* 579, 3707-3712.
- Krause, K.**, Krupinska, K. (2009) Nuclear regulators with a second home in organelles. *Trends Plant Sci.* 14, 194-199.
- Krause, K.**, Oetke, S., Krupinska, K. (2012) Dual targeting and retrograde translocation: regulators of plant nuclear gene expression can be sequestered by plastids. *Int J Mol Sci.* 13, 11085-11101.
- Krenz, B.**, Windeisen, V., Wege, C., Jeske, H., Kleinow, T. (2010) A plastid-targeted heat shock cognate 70 kDa protein interacts with the Abutilon mosaic virus movement protein. *Virology*. 401, 6–17.
- Kroll, D.**, Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, U. C., Soll, J., Westhoff, P. (2001) VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *PNAS*. 98, 4238-4242.
- Krupinska, K.**, Haußühl, K., Schäfer, A., van der Kooij, T. A., Leckband, G., Lörz, H., Falk, J. (2002) A novel nucleus targeted protein is expressed in barley leaves during senescence and pathogen infection. *Plant Physiol.* 130, 1172-1180.
- Krupinska, K.**, Desel, C., Mulisch, M. (2010) Stromuli. Plastiden-Brücken im Netzwerk der Zelle. *BiuZ* 40, 162-170.
- Krupinska, K.** (2011) Informationsaustausch in der Pflanzenzelle: Plastiden und Zellkern im Zwiegespräch. *BiuZ*. 41, 298-305.
- Krupinska, K.**, Melonek, J., Krause, K. (2012) New insights into plastid nucleoid structure and functionality. *Planta*. doi: 10.1007/s00425-012-1817-5.
- Kühlbrandt, W.**, Wang, D. N., Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*. 367, 614-621.
- Kuroiwa, T.**, Kawano, S., Nishibayashi, S., Sato, C. (1982) Epifluorescent microscopic evidence for maternal inheritance of chloroplast DNA. *Nature*. 298, 481–483.
- Kuroiwa, T.** (1991) The replication, differentiation, and inheritance of plastids with emphasis on the concept of organelle nuclei. *Int Rev Cytol* 128, 1–62.
- Kwon, C.**, Chung, I. K. (2004) Interaction of an Arabidopsis RNA-binding protein with plant single-stranded telomeric DNA modulates telomerase activity. *J of Biol Chem*. 279, 12812-12818.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- Lai, C.**, Xiong, J., Li, X., Qin, X. (2009) A 43-bp A/T-rich element upstream of the kinesin gene *AtKP1* promoter functions as a silencer in Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* 28, 851–860.
- Laizet, Y.**, Pontier, D., Mache, R., Kuntz, M. (2004) Subfamily organization and phylogenetic origin of genes encoding plastid lipid-associated proteins of the fibrillin type. *J Gen Sci Tec.* 3, 19-28.
- Lalonde, S.**, Ehrhardt, D. W., Loque, D., Chen, J., Rhee, S. Y., Frommer, W. B. (2008) Molecular and cellular approaches for the detection of protein–protein interactions: latest techniques and current limitations. *Plant J.* 53, 610-635.
- Leister, D.** (2005) Genomics-based dissection of the cross-talk of chloroplasts with the nucleus and mitochondria in Arabidopsis. *Gene*. 354, 110-116.
- Leister, D.** (2012) Retrograde signaling in plants: from complex to simple scenarios. *Front Plant Sci.* 3. doi: 10.3389/fpls.2012.00135.
- León, P.**, Gregorio, J., Córdoba, E. (2012) ABI4 and its role in chloroplast retrograde communication. *Front Plant Sci.* 3, doi: 10.3389/fpls.2012.00304.
- Lewis, J. D.**, Lazarowitz, S. G. (2010) Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *PNAS*. 107, 2491–2496.
- Li, Z.**, Clarke, A. J., Beveridge, T. J. (1998) Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *J Bacteriol.* 180, 5478-5483.
- Li, X.**, Ilarslan, H., Brachova, L., Qian, H. R., Li, L., Che, P., Wurtele, E. S., Nikolau, B. J. (2010) Reverse-genetic analysis of the two biotin-containing subunit genes of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase in Arabidopsis indicates a unidirectional functional redundancy. *Plant Physiol.* 155, 293-314.
- Lin, C.**, Thomashow, M. F. (1992) DNA sequence analysis of a complementary DNA for cold-regulated Arabidopsis gene *cor15* and characterization of the COR 15 polypeptide. *Plant Physiol.* 99, 519–525.
- Ling, Q.**, Huang, W., Baldwin, A., Jarvis, P. (2012) Chloroplast biogenesis is regulated by direct action of the ubiquitin-proteasome system. *Science*. 338, 655-659.

- Livak, K. J., Schmittgen, T. D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods*. 25, 402–408.
- Loveys, B. R.** (1977) Intracellular location of abscisic acid in stressed and non-stressed leaf tissue. *Physiol Plant*. 40, 6–10.
- Luo, M., Orsi, R., Patrucco, E., Pancaldi, S., Cella, R.** (1997) Multiple transcription start sites of the carrot dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene, and sub-cellular localization of the bi-functional protein. *Plant Mol Biol*. 33, 709–722.
- Majeran, W., Friso, G., Asakura, Y., Qu, X., Huang, M., Ponnala, L., Watkins, K. P., Barkan, A., van Wijk, K. J.** (2012) Nucleoid-enriched proteomes in developing plastids and chloroplasts from maize leaves: a new conceptual framework for nucleoid functions. *Plant Physiol*. 158, 156–189.
- Malinovsky, F. G., Brodersen, P., Fiil, B. K., McKinney, L. V., Thorgrimsen, S., Beck, M., Nielsen, H. B., Pietra, S., Zipfel, C., Robatzek, S., Petersen, M., Hofius, D., Mundy, J.** (2010) Lazarus1, a DUF300 protein, contributes to programmed cell death associated with *Arabidopsis* *acd11* and the hypersensitive response. *PLoS One*. 5. doi: 10.1371/journal.pone.0012586.
- Maréchal, A., Parent, J. S., Sabar, M., Véronneau-Lafortune, F., Abou-Rached, C., Brisson, N.** (2008) Overexpression of mtDNA-associated AtWhy2 compromises mitochondrial function. *BMC Plant Biol*. 8, doi: 10.1186/1471-2229-8-42.
- Maréchal, A., Parent, J. S., Véronneau-Lafortune, F., Joyeux, A., Lang, B. F., Brisson, N.** (2009) Whirly proteins maintain plastid genome stability in *Arabidopsis*. *PNAS*. 106, 14693–14698.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoeber, B., Hasegawa, M., Penny, D.** (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *PNAS* 99, 12246–12251.
- Meier, I., Phelan, T., Gruissem, W., Spiker, S., Schneider, D.** (1996) MFP1, a novel plant filament-like protein with affinity for matrix attachment region DNA. *Plant Cell*. 8, 2105–2115.
- Melonek, J., Mulisch, M., Schmitz-Linneweber, C., Grabowski, E., Hensel, G., Krupinska, K.** (2010) Whirly1 in chloroplasts associates with intron containing RNAs and rarely co-localizes with nucleoids. *Planta*. 232, 471–481.
- Melonek, J., Matros, A., Trösch, M., Mock, H. P., Krupinska, K.** (2012) The core of chloroplast nucleoids contains architectural SWIB domain proteins. *Plant Cell*. 24, 3060–3073.
- Mereschkowsky, C.** (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreich. *Biol. Centralbl.* 25, 593–604.
- Mitchell, P.** (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 191, 144–148.
- Mitchell, P. J., Tjian, R.** (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*. 245, 371–378.
- Mullineaux, P., Karpinski, S.** (2002) Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Curr Opin Plant Biol*. 5, 43–48.
- Nomura, H., Komori, T., Uemura, S., Kanda, Y., Shimotani, K., Nakai, K., Furuichi, T., Takebayashi, K., Sugimoto, T., Sano, S., Suwastika, I. N., Fukusaki, E., Yoshioka, H., Nakahira, Y., Shiina, T.** (2012) Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in *Arabidopsis*. *Nat Commun*. 3. doi:10.1038/ncomms1926.
- Oelmüller, R., Levitan, I., Bergfeld, R., Rajasekhar, V. K., Mohr, H.** (1986) Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on plastids. *Planta*. 168, 482–492.
- Oelmüller, R., Mohr, H.** (1986) Photooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for expression of nuclear genes. *Planta*. 167, 106–113.
- Papenbrock, J., Grimm, B.** (2001) Regulatory network of tetrapyrrole biosynthesis - studies of intracellular signalling involved in metabolic and developmental control of plastids. *Planta*. 213, 667–681.
- Peyret, P., Perez, P., Alric, M.** (1995) Structure, genomic organization, and expression of the *Arabidopsis thaliana* aconitase gene. Plant aconitase show significant homology with mammalian iron-responsive element-binding protein. *J Biol Chem*. 270, 8131–8137.
- Pfalz, J., Liere, K., Kandlbinder, A., Dietz, K. J., Oelmüller, R.** (2006) pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *Plant Cell*. 18, 176–197.
- Pfalz, J., Pfannschmidt, T.** (2013) Essential nucleoid proteins in early chloroplast development. *Trends Plant Sci*. 18, 186–194.
- Pfannschmidt, T., Schütze, K., Fey, V., Sherameti, I., Oelmüller, R.** (2003) Chloroplast redox control of nuclear gene expression - a new class of plastid signals in interorganellar communication. *Antioxid Redox Signal*. 5, 95–101.

- Pogson, B. J.**, Woo, N. S., Förster, B., Small, I. D. (2008) Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends Plant Sci.* 13, 602-609.
- Pogson, B. J.**, Albrecht, V. (2011) Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: an overview. *Plant Physiol.* 155, 1545-1551.
- Prikryl, J.**, Watkins, K. P., Friso, G., van Wijk, K. J., Barkan, A. (2008) A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis. *Nucleic Acids Res.* 36, 5152-5165.
- Rajjou, L.**, Belghazi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C., Job, D. (2006) Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on Arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiol.* 141, 910-923.
- Rascke, K.** (1975) Simultaneous requirement of carbon dioxide and abscisic acid for stomatal closing in *Xanthium strumarium* L.. *Planta.* 125, 243-259.
- Raynaud, C.**, Perennes, C., Reuzeau, C., Catrice, O., Brown, S., Bergounioux, C. (2005) Cell and plastid division are coordinated through the prereplication factor AtCDT1. *PNAS.* 102, 8216-8221.
- Raynaud, C.**, Sozzani, R., Glab, N., Domenichini, S., Perennes, C., Cella, R., Kondorosi, E., Bergounioux, C. (2006) Two cell-cycle regulated SET-domain proteins interact with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in Arabidopsis. *Plant J.* 47, 395-407.
- Rokka, A.**, Suorsa, M., Saleem, A., Battchikova, N., Aro, E.-M. (2005) Synthesis and assembly of thylakoid protein complexes: multiple assembly steps of photosystem II. *Biochem J.* 388, 159-168.
- Romano, P. G.**, Horton, P., Gray, J. E. (2004) The Arabidopsis cyclophilin gene family. *Plant Physiol.* 134, 1268-1282.
- Rook, F.**, Hadingham, S. A., Li, Y., Bevan, M. W. (2006) Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant Cell Environ.* 29, 426-434.
- Rosso, D.**, Bode, R., Li, W., Krol, M., Saccon, D., Wang, S., Schillaci, L. A., Rodermeil, S. R., Maxwell, D. P., Hüner, N. P. (2009) Photosynthetic redox imbalance governs leaf sectoring in the *Arabidopsis thaliana* variegation mutants immutans, spotty, var1, and var2. *Plant Cell.* 21, 3473-3492.
- Ruckle, M. E.**, DeMarco, S. M., Larkin, R. M. (2007) Plastid signals remodel light signaling networks and are essential for efficient chloroplast biogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell.* 19, 3944-3960.
- Ruckle, M. E.**, Larkin, R. M. (2009) Plastid signals that affect photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana* are dependent on GENOMES UNCOUPLED 1 and cryptochrome 1. *New Phytol.* 182, 367-379.
- Saha, D.**, Prasada, A., Srinivasan, R. (2007) Pentatricopeptide repeat proteins and their emerging roles in plants. *Plant Physiol Biochem.* 45, 521-534.
- Sakai, A.**, Takano, H., Kuroiwa, H. (2004) Organelle nuclei in higher plants: structure, composition, function, and evolution. *Int Rev Cytol.* 238, 59-118.
- Sambrook, J.**, Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. New York, Cold Spring Harbor Press.
- Samaniego, R.**, de la Torre, C., Moreno Diaz de la Espina, S. (2008) Characterization, expression and subcellular distribution of a novel MFP1 (matrix attachment region-binding filament-like protein 1) in onion. *Protoplasma.* 233, 31-38.
- Sandmann, G.**, Böger, P. (1989) "Inhibition of carotenoid biosynthesis by herbicides," in *Target Sites of Herbicide Action*, ed. S. G. Böger (Boca Raton, FL, USA: CRC Press), 25-44.
- Sarry, J. E.**, Kuhn, L., Ducruix, C., Lafaye, A., Junot, C., Hugouvieux, V., Jourdain, A., Bastien, O., Fievet, J. B., Vailhen, D., Amekraz, B., Moulin, C., Ezan, E., Garin, J., Bourguignon, J. (2006) The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics.* 6, 2180-2198.
- Sato, N.**, Ohshima, K., Watanabe, A., Ohta, N., Nishiyama, Y., Joyard, J., Douce, R. (1998) Molecular characterization of the PEND protein, a novel bZIP protein present in the envelope membrane that is the site of nucleoid replication in developing plastids. *Plant Cell.* 10, 859-872.
- Schmitz-Linneweber, C.**, Williams-Carrier, R. E., Williams-Voelker, P. M., Kroeger, T. S., Vichas, A., Barkan, A. (2006) A pentatricopeptide repeat protein facilitates the trans-splicing of the maize chloroplast rps12 pre-mRNA. *Plant Cell.* 18, 2650-2663.
- Schmitz-Linneweber, C.**, Small, I. (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci.* 13, 663-670.
- Schöning, J. C.**, Streitner, C., Page, D. R., Hennig, S., Uchida, K., Wolf, E., Furuya, M., Staiger, D. (2007) Auto-regulation of the circadian slave oscillator component AtGRP7 and regulation of its targets is impaired by a single RNA recognition motif point mutation. *Plant J.* 52, 1119-1130.



- Schreiber, U.**, Schliwa, U., Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Res.* 10, 51-62.
- Schröter, Y.**, Steiner, S., Matthäi, K., Pfannschmidt, T. (2010) Analysis of oligomeric protein complexes in the chloroplast sub-proteome of nucleic acid-binding proteins from mustard reveals potential redox regulators of plastid gene expression. *Proteomics*. 10, 2191-2204.
- Schumacher, M. A.**, Karamooz, E., Zíková, A., Trantírek, L., Lukeš, J. (2006) Crystal structures of *T. brucei* MRP1/MRP2 guide-RNA binding complex reveal RNA matchmaking mechanism. *Cell*. 126, 701-711.
- Seo, M.**, Koshiba, T. (2011) Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action. *J Plant Res.* 124, 501-507.
- Settles, A. M.**, Martienssen, R. (1998) Old and new pathways of protein export in chloroplasts and bacteria. *Trends Cell Biol.* 8, 494-501.
- Shang, Y.**, Yan, L., Liu, Z.-Q., Cao, Z., Mei, C., Xin, Q., Wu, F.-Q., Wang, X.-F., Du, S.-Y., Jiang, T., Zhang, X.-F., Zhao, R., Sun, H.-L., Liu, R., Yu, Y.-T., Zhang, D.-P. (2010) The Mg-Chelatase H subunit of Arabidopsis antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition. *Plant Cell*. 22, 1909-1935.
- Shanmugabalaji, V.**, Besagni, C., Piller, L. E., Douet, V., Ruf, S., Bock, R., Kessler, F. (2013) Dual targeting of a mature plastoglobulin/fibrillin fusion protein to chloroplast plastoglobules and thylakoids in transplastomic tobacco plants. *Plant Mol Biol.* 81, 13-25.
- Shen, Y. Y.**, Wang, X. F., Wu, F. Q., Du, S. Y., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X. L., Peng, C. C., Yu, X. C., Zhu, S. Y., Fan, R. C., Xu, Y. H., Zhang, D. P. (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature*. 443, 823-826.
- Shkolnik-Inbar, D.**, Bar-Zvi, D. (2011) Expression of ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4 (ABI4) in developing Arabidopsis seedlings. *Plant Signal Behav.* 6, 694-696.
- Silva-Filho, M. C.** (2003) One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct sub-cellular locations. *Curr Opin Plant Biol.* 6, 589-595.
- Singh, D. K.**, McNellis, T. W. (2011) Fibrillin protein function: the tip of the iceberg? *Trends Plant Sci.* 16, 432-441.
- Small, I.**, Wintz, H., Akashi, K., Mireau, H. (1998) Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol Biol.* 38, 265-277.
- Small, I. D.**, Peeters, N. (2000) The PPR motif – a TRP-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci.* 25, 46-47.
- Soltys, B. J.**, Gupta, R. S. (1996) Immunoelectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells. *Exp Cell Res.* 222, 16-27.
- Southern, E. M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98, 503-517.
- Streitner, C.**, Danisman, S., Wehrle, F., Schöning, J. C., Alfano, J. R., Staiger, D. (2008) The small glycine-rich RNA binding protein AtGRP7 promotes floral transition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 56, 239-250.
- Ströher, E.**, Dietz, K. J. (2008) The dynamic thiol-disulphide redox proteome of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast as revealed by differential electrophoretic mobility. *Physiol Plant.* 133, 566-583.
- Sugiura, M.** (1992) The chloroplast genome. *Plant Mol Biol.* 19, 149-168.
- Sullivan, J. A.**, Gray, J. C. (1999) Plastid translation is required for the expression of nuclear photosynthesis genes in the dark and in roots of the pea *lip1* mutant. *Plant Cell*. 11, 901-910.
- Sun, X.**, Feng, P., Xu, X., Guo, H., Ma, J., Chi, W., Lin, R., Lu, C., Zhang, L. (2011) A chloroplast envelope-bound PHD transcription factor mediates chloroplast signals to the nucleus. *Nat Commun.* 2, 477.
- Sunderland, P. A.**, West, C. E., Waterworth, W. M., Bray, C. M. (2006) An evolutionarily conserved translation initiation mechanism regulates nuclear or mitochondrial targeting of DNA ligase 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 47, 356-367.
- Surpin, M.**, Larkin, R. M., Chory, J. (2002) Signal transduction between the chloroplast and the nucleus. *Plant Cell*. 14, 327-338.
- Susek, R. E.**, Ausubel, F. M., Chory, J. (1993) Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell*. 74, 787-799.
- Strand, A.** (2004) Plastid-to-nucleus signalling. *Curr Opin Plant Biol.* 7, 621-625.
- Tarasenko, V. I.**, Katyshev, A. I., Subota, I. Y., Konstantinov, Y. M. (2012) Recombinant Arabidopsis WHY2 protein binds unspecifically to single-stranded DNA and is phosphorylated by mitochondrial protein kinases. *Plant Omics*. 5, 372-375.

- Taylor, R. M.**, Hamer, M. J., Rosamond, J., Bray, C. M. (1998) Molecular cloning and functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* DNA ligase I homologue. *Plant J.* 15, 75–81.
- Terasawa, K.**, Sato, N. (2009) Plastid localization of the PEND protein is mediated by a noncanonical transit peptide. *FEBS J.* 276, 1709–1719.
- Timmis, J. N.**, Ayliffe, M. A., Huang, C. Y., Martin, W. (2004) Endosymbiotic gene transfer : Organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Rev.* 5, 123–135.
- Tjalsma, H.**, Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S., van Dijl, J. M. (2000) Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64, 515–547.
- Tsuzuki, T.**, Takahashi, K., Inoue, S., Okigaki, Y., Tomiyama, M., Hossain, M. A., Shimazaki, K., Murata, Y., Kinoshita, T. (2011) Mg-chelatase H subunit affects ABA signaling in stomatal guard cells, but is not an ABA receptor in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res.* 124, 527–538.
- Vallon, O.**, Hoyer-Hansen, G., Simpson, D. J. (1987) Photosystem II and cytochrome *b*-559 in the stroma lamellae of barley chloroplasts. *Carlsberg Res Commun.* 52, 405–421.
- Vermel, M.**, Guermann, B., Delage, L., Grienemberger, J. M., Maréchal-Drouard, L., Gualberto, J. M. (2002) A family of RRM-type RNA-binding proteins specific to plant mitochondria. *PNAS.* 99, 5866–5871.
- Voigt, C.**, Oster, U., Bornke, F., Jahns, P., Dietz, K.-J., Leister, D., Kleine, T. (2010) In-depth analysis of the distinctive effects of norflurazon implies that tetrapyrrole biosynthesis, organellar gene expression and ABA cooperate in the GUN-type of plastid signalling. *Physiol Plant.* 138, 503–519.
- Watson, J. M.**, Riha, K. (2010) Comparative biology of telomeres: where plants stand. *FEBS Lett.* 584, 3752–3759.
- Wildermuth, M. C.**, Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F. M. (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature.* 414, 562–565.
- Woodson, J. D.**, Chory, J. (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat Rev Genet.* 9, 383–395.
- Wu, F. Q.**, Xin, Q., Cao, Z., Liu, Z. Q., Du, S. Y., Mei, C., Zhao, C. X., Wang, X. F., Shang, Y., Jiang, T., Zhang, X. F., Yan, L., Zhao, R., Cui, Z. N., Liu, R., Sun, H. L., Yang, X. L., Su, Z., Zhang, D. P. (2009) The magnesium-chelatase H subunit binds abscisic acid and functions in abscisic acid signaling: new evidence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 150, 1940–1954.
- Xiong, J. Y.**, Lai, C. X., Qu, Z., Yang, X. Y., Qin, X. H., Liu, G. Q. (2009) Recruitment of AtWHY1 and AtWHY3 by a distal element upstream of the kinesin gene AtKP1 to mediate transcriptional repression. *Plant Mol Biol.* 71, 437–449.
- Xu, Q.**, Traag, B. A., Willemse, J., McMullan, D., Miller, M. D., Elsliger, M. A., Abdubek, P., Astakhova, T., Axelrod, H. L., Bakolitsa, C., Carlton, D., Chen, C., Chiu, H. J., Chruszcz, M., Clayton, T., Das, D., Deller, M. C., Duan, L., Ellrott, K., Ernst, D., Farr, C. L., Feuerhelm, J., Grant, J. C., Grzechnik, A., Grzechnik, S. K., Han, G. W., Jaroszewski, L., Jin, K. K., Klock, H. E., Knuth, M. W., Kozbial, P., Krishna, S. S., Kumar, A., Marciano, D., Minor, W., Mommaas, A. M., Morse, A. T., Nigoghossian, E., Nopakun, A., Okach, L., Oommachen, S., Paulsen, J., Puckett, C., Reyes, R., Rife, C. L., Sefcovic, N., Tien, H. J., Trame, C. B., van den Bedem, H., Wang, S., Weekes, D., Hodgson, K. O., Wooley, J., Deacon, A. M., Godzik, A., Lesley, S. A., Wilson, I. A., van Wezel, G. P. (2009) Structural and functional characterizations of SsgB, a conserved activator of developmental cell division in morphologically complex actinomycetes. *J Biol Chem.* 11, 25268–25279.
- Xu, Y. Z.**, Arrieta-Montiel, M. P., Viridi, K. S., de Paula, W. B., Widhalm, J. R., Basset, G. J., Davila, J. I., Elthon, T. E., Elowsky, C. G., Sato, S. J., Clemente, T. E., Mackenzie, S. A. (2011a) MutS HOMOLOG1 is a nucleoid protein that alters mitochondrial and plastid properties and plant response to high light. *Plant Cell.* 23, 3428–3441.
- Xu, Y. H.**, Liu, R., Yan, L., Liu, Z. Q., Jiang, S. C., Shen, Y. Y., Wang, X. F., Zhang, D. P. (2011b) Light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 63, 1095–1106.
- Yamaguchi, K.**, Subramanian, A. R. (2000) The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 50 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J Biol Chem.* 275, 28466–28482.
- Yamaguchi, K.**, Prieto, S., Beligni, M. V., Haynes, P. A., McDonald, W. H., Yates, J. R. 3rd, Mayfield, S. P. (2002) Proteomic characterization of the small subunit of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast ribosome: identification of a novel S1 domain-containing protein and unusually large orthologs of bacterial S2, S3, and S5. *Plant Cell.* 14, 2957–2974.
- Yang, Y.**, Sulpice, R., Himmelbach, A., Meinhard, M., Christmann, A., Grill, E. (2006) Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *PNAS.* 103, 6061–6066.



- Yogev, O.**, Pines, O. (2011) Dual targeting of mitochondrial proteins: mechanism, regulation and function. *Biochim Biophys Acta*. 1808, 1012-1020.
- Yoo, H. H.**, Kwon, C., Lee, M. M., Chung, I. K. (2007) Single-stranded DNA binding factor AtWHY1 modulates telomere length homeostasis in Arabidopsis. *Plant J*. 49, 442-451.
- Yoshida, R.**, Sato, T., Kanno, A., Kameya, T. (1998) Streptomycin mimics the cool temperature response in rice plants. *J Exp Bot*. 49, 221-227.
- Young, L.**, Leonhard, K., Tatsuta, T., Trowsdale, J., Langer, T. (2001) Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science*. 16, 2135-2138.
- Yu, F.**, Fu, A., Aluru, M., Park, S., Xu, Y., Liu, H., Liu, X., Foudree, A., Nambogga, M., Rodermel, S. (2007) Variegation mutants and mechanisms of chloroplast biogenesis. *Plant Cell Environ*. 30, 350-365.
- Yusa, F.**, Steiner, J. M., Löffelhardt, W. (2008) Evolutionary conservation of dual Sec translocases in the cyanelles of *Cyanophora paradoxa*. *BMC Evol Biol*. 1, 304.
- Zeke, A.**, Lukács, M., Lim, W. A., Reményi, A. (2009) Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. *Trends Cell Biol*. 19, 364-374.
- Zhang, L.**, Kato, Y., Otters, S., Vothknecht, U. C., Sakamoto, W. (2012) Essential role of VIPP1 in chloroplast envelope maintenance in Arabidopsis. *Plant Cell*. 24, 3695-3707.
- Zheng, B.**, Halperin, T., Hruskova-Heidingsfeldova, O., Adam, Z., Clarke, A. K. (2002) Characterization of chloroplast Clp proteins in Arabidopsis: localization, tissue specificity and stress responses. *Physiol Plant*. 114, 92-101.
- Zybailov, B.**, Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q., van Wijk, K. J. (2008) Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS*. 3, e1994. doi:10.1371/journal.pone.0001994.

## 7. Anhang

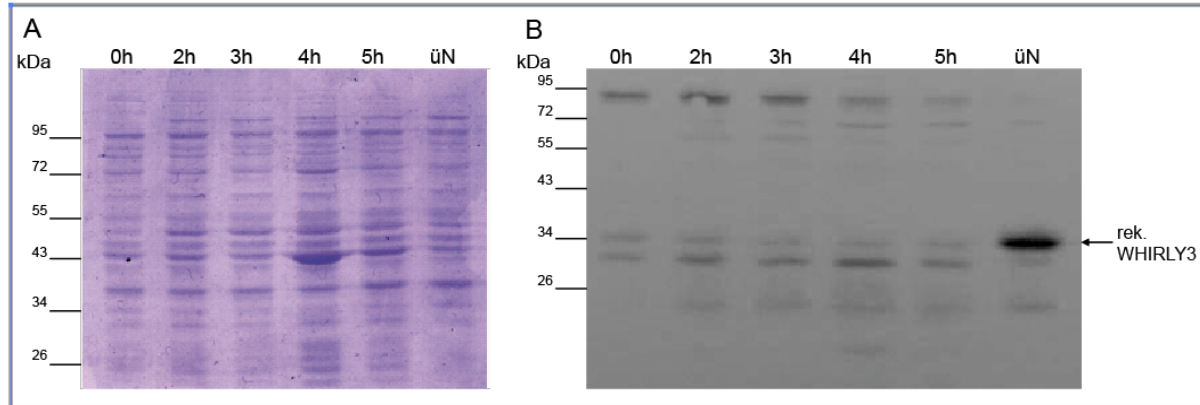
7.1 Überexpression von WHIRLY3 in *Escherichia coli*

Abb. A1: Überexpression des *WHIRLY3*-Gens in *E. coli* Zellen. Mittels des Gateway®-Systems wurde die kodierende Sequenz von *WHIRLY3* in den Expressionsvektor pDEST17 eingebracht, mit dessen Hilfe das rekombinante *WHIRLY3*-Protein in BL-21 Zellen hergestellt wurde. Die Bakterienzellen wurden 0, 2, 3, 4 und 5 h bzw. am nächsten Tag (üN) nach Induktion der Expression geerntet. Proteinextrakte aus den geernteten Bakterienkulturen wurden immunologisch untersucht. Die Detektion erfolgte mit  $\alpha$ -*WHIRLY3* (B). Zur Kontrolle wurde ein vergleichbares Gel mit Coomassie-Brillantblau gefärbt (A). Das rekombinante *WHIRLY3*-Protein besitzt ein sechsfaches His-Tag an seinem N-Terminus und ein C-Myc-Tag am C-Terminus. Da der Sequenz ein Stoppcodon fehlt, werden Teile des Vektors mit translatiert.

```

ATGTCGTA6xHisCTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGCC
GCCCCCTTCACTTATGTGCGCAGCTGTTATCTTCTCCTCCAATGGCGGTTTTCTCCAAAACCTTCATAAACCAT
AGTTTTCAGATGCTCGTTTTCTCTCTCTCACTCAATTCTCACCTCCGGTGGATTGCGCCGAAAAATTATTCCT
TTAAACCGACGCGGAGGTTGAAATTAACGGTGAAGTCTCGACAAAGTGATTACTTTGAGAAACAGAGGTTT
GGTGACTCGTCTTCTTCGAAAACGCTGAAGTATCTTCTCCTAGATTTTACGTGGGTCATTTCGATTACAAAAG
GGAAAGCTGCTCTTACGATAGAACCACGAGCACCAGAGTTTGTGGCTTTGGAATCTGGTGCGTTCAAGCTGA
CAAAGGAAGGTTTTTTGTTGCTCCAATTTGCTCCTGCAGCTGGTGTCGTCAATATGATTGGAGTAGGAAGCA
GGTCTTCTCGTTGTCGGTTACAGAAATCGGTAATCTAGTTAGCCTTGGGCCGAGGGAATCATGTGAATTCCTC
CATGATCCATTCAAGGGAAAAGGTAGTGATGAAGGTAAAGTGAGGAAAAGTGTTGAAAGTTGAGCCGCTCCCA
GATGGTTCTGGCCGCTTCTTTAACCTGAGTGTTCAAAACAAGCTCTTGAATGTAGATGAGAGTGATACATAC
CAATCACTAAAGCAGAGTTTGCTGTTCTTATCTCTGCTTTCAACTTCGTCTTGCCGCACCTTATAGGCTGGAG
TGCATTTTGCTAACTCCATCAAAACCAGAAGACTTAACCGCCTTAACAATGCTTCGCCTAAGTATGGAGGAGAC
TACGAATGGAGTAGAGGAGCAGAAGCTATCTCAGAGGAGGACCTGAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAG
CTTTCTTGTACAAGTGGTTGATTCGAGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCAC
CGCTGAGCAATAACTAG

```

```

MSYYHHHHHHLESTSLYKKAGSAAAPFTMSQLLSSPPMAVFSKTFINHKFSDARFLSSHSILTSGGFAGKIPLKPT
ARLKLTVKSRQSDYFEKQRFQDSSSSQNAEVSSPRFYVGH3xHisSIYKGKAALCACTTTIEPRAPEFVALESGAFKLCACTTTKEGFLLL
QFAPAAGVRQYDWSRKQVFSLSVTEIGNLVSLGPRESCEFFHDPFKGKSDEGKVRKVLKVEPLPDGSGRFFNL
SVQNKLLNVDESSVYIPITKAEFVLISAFNSVLPHLIGWSAFANSIKPEDSNRLNNASPKYGGDYEWSREEQKLISE
EDLKGGRADPAFLYKVVDSRLLTKPERKLSWLLPPLSNN*

```

Abb. A2: Sequenz des *WHIRLY3*-Konstruktes (oben) und des rekombinanten Proteins (unten). Rot: 6 x His, grün: CACCC Überhang, schwarz: *WHIRLY3*-Sequenz, blau: C-Myc-Tag, orange: Teil des pDEST17-Vektors vor dem Stoppcodon. In rot sind die durch die Vektorsequenzen zusätzlich angefügten 43 Aminosäuren dargestellt. Das Protein hat ein theoretisches Molekulargewicht von 38,3 kDa.

## 7.2 Immunologischer Nachweis von WHIRLY3 in isolierten Chloroplasten

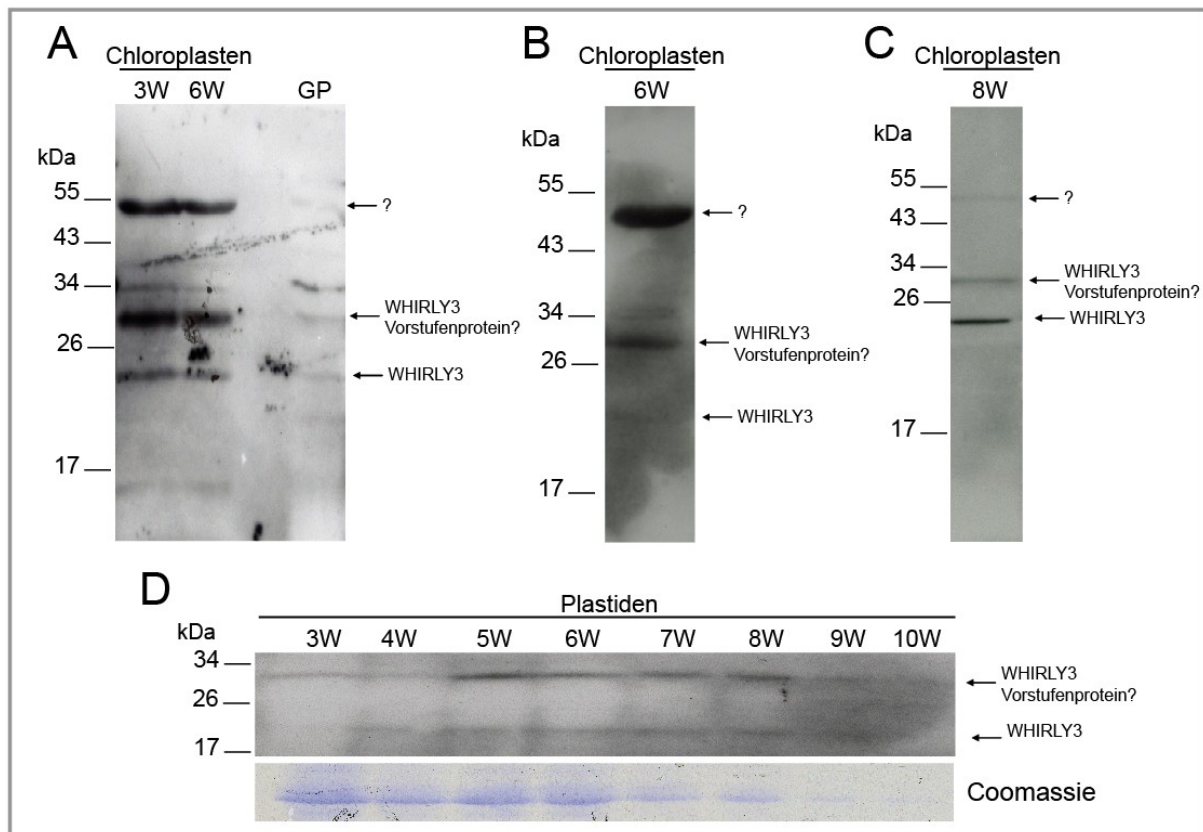


Abb. A3: Nachweis des WHIRLY3-Proteins in Chloroplastenfraktionen aus Rosetten-blättern des Wildtyps von *A. thaliana* aus vier verschiedenen Anzuchten. Der immunologische Nachweis erfolgte mittels  $\alpha$ -WHIRLY3. **A** Proteine aus Chloroplasten von drei bzw. sechs Wochen alten Pflanzen (3W, 6W) wurden zusammen mit einem Gesamtproteinextrakt (GP) untersucht. Die Anzucht erfolgte auf Erde. **B** Chloroplasten von auf Erde angezogenen Pflanzen. **C** und **D** Chloroplasten von in Torfquelltöpfen angezogenen Pflanzen. Das Alter der für die Chloroplastenisolierung verwendeten Pflanzen in Wochen (W) ist in B, C, und D über den Spuren angegeben.

7.3 *WHIRLY3*-Konstrukte für das Hefe-2-Hybridsystem

Abb. A4: **A** Schematische Darstellung der *WHIRLY3*-Konstrukte, die für die Durchmusterung der cDNA-Bank erstellt wurden. Das Konstrukt  $\Delta PTP$  besteht aus der *WHIRLY3*-Sequenz ohne die Nukleotide, die für die plastidäre Importsequenz kodieren. Dem Konstrukt  $\Delta PTP$ -AD fehlt zusätzlich die Sequenz für die Autoregulationsdomäne. Beide Konstrukte wurden durch Einbringen in den pGBKT7 Vektor mit der GAL4-DNA-Bindedomäne (GAL4-DNA-BD) fusioniert. **B** Ergebnis eines X-Gal-Assays mit Hefen, die die Konstrukte  $\Delta PTP$  und  $\Delta PTP$ -AD exprimieren. Mit den beiden Konstrukte wurden jeweils Hefen des Stammes Y187 transformiert (2.6.4). Ein X-Gal-Assay (2.6.7) zeigte, dass das Konstrukt  $\Delta PTP$  mit der Autoregulationsdomäne tatsächlich zu einer schwachen Aktivierung des Reportergens *lacZ* führte und somit ungeeignet für die Durchmusterung der cDNA-Bank war.

### 7.3 Mittels Hefe-2-Hybridsystem identifizierte mögliche Interaktionspartner von WHIRLY3

Tab. A1: Mögliche Interaktionspartner des WHIRLY3-Proteins, die mit dem Hefe-2-Hybridsystem identifiziert wurden. Für die Proteine COR15, CDKG1, PSBR, Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase, ein Protein aus der Familie der Molybdän Kofaktor Sulfurasen, eine Glykosyl-Transferase und GRP7/CCR2 wurde die Interaktion mit WHIRLY3 in Hefen erneut getestet (2.6.3), wobei sich bei keinem der untersuchten Kandidaten ein Hinweis auf eine tatsächliche Interaktion zeigte. Bei diesem zweiten Test in Hefen als unspezifisch identifizierte Interaktionspartner sind blau unterlegt.

Protein	Accession number	Anzahl der Kolonien	Lokalisation	Beschreibung	Literatur
TPR-Protein	At1g07590	1	Mitochondrium	Tetratricopeptid-Protein	TAIR; Sarry et al., 2006
BT11	At4g23630	1	ER, Plasmamembran, Vakuole	interagiert mit einem Protein aus <i>A. tumefaciens</i> (VirB2)	Hwang und Gelvin, 2004
COR15	At2g42540	1	Stroma	kältereguliertes LEA-Protein; Schutz von Stromaproteinen bei Kühle	Lin und Tomachow, 1992; Hundertmark und Hinch, 2008;
CDKG1	At5g63370	1	unbekannt	Protein aus der Familie der Serin/Threonin-Kinasen; Phosphorylierung	Huang et al., 2013
Aminosäure-transporterprotein	At2g41190	1	Membranen	Transmembranprotein; transportiert Aminosäuren	TAIR
PSBR	At1g79040	1	PS II	10 kDa Untereinheit des PSII; involviert in Zusammenbau des PSII	Rokka et al., 2005
Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase	At3g6340	1	Cytoplasma	Proteinfaltung; RNA-Spleissen	Romano et al., 2004
SYTA	At2g20990	1	Plasmamembran	hat Ähnlichkeit zu Synaptotagminen ; Kälte- und Salztoleranz; Virus-transport von Zelle zu Zelle	Lewis und Lazarowitz, 2010; Eckardt, 2008
unbekanntes Protein	At5g44720	1	Mitochondrium	Molybdän KofaktorSulfurase	TAIR
unbekanntes Protein	At4g14100	1	Vakuole, Plastiden	Glykosyltransferase	TAIR
GRP7/CCR2	At2g21660	1	Cytoplasma, Zellkern	glycinreiches RNA-Bindeprotein; kältereguliert; steuert Stomataöffnung und Stresstoleranz	Schöning et al., 2007; Streitner et al., 2008
unbekanntes Protein	At3g26510	1	unbekannt	Ocicosapeptide/Phox/Bem1p-Domäne (PB1)	TAIR
MLP43	At1g70890	1	Plastiden	involviert in Abwehr von Pathogenen	TAIR

## 7.4 Aminosäuresequenzen der mittels Koimmunpräzipitation ermittelten Interaktionspartner von WHIRLY3

PPR4: MDNGGSVL<sup>SLSAPHFPYSATILRRHSPVASISFSLKQPPQPPEPPESPPDLRRPEK</sup><sup>SIGSSSSSSSPS</sup>  
<sup>PIPSPK</sup>PIPSPKT<sup>PLKINPLKGLTNRSSVSPLVQSEVSSKVSSFGSSLASK</sup>LRLSSKLSPPPPPPPPPVEETTQF  
RDEF<sup>SDTKPPEEETR</sup>SDTKPPEEETRNP<sup>NPQQEFR</sup>NPQQEFRQEGKIFVGNLPTWIKK<sup>KPEFEFFFR</sup>KPEFEFFFRQFGPIENVILIKGHHEVEKNAG  
FGFIIYAAEKSAMKAVEFDGVEFHGRILTVKLDDGKRLKTKAEQVRVWVEEGEEDTKMSNKSSWHQER  
EGSRKLSQRILDTNGDNWQAVISAFEKISKPSRTEFGLMVKFYGRRGDMHRARETFERMARGITPTS  
<sup>IYTSLIHAYAVGR</sup>IYTSLIHAYAVGRDMDEALSCVRKMKEEGIEMSLVTVSVIVGGFSKAGHAEAAADYWFDEAKRIHKTNLN  
ASIYGKIIYAHQCQTCNMERAEALVREMEEEGIDAPIAIYHTMMDGYTMVADEKKGLVVF<sup>KRLKECGFTPT</sup>  
VVTYGC<sup>LINLYTKVGKISKALEVSRVMKEEGVKHNLKTYSMMINGFVKLKD</sup>WANAFV<sup>FEDMVKEGMK</sup>  
PDVILYNNIISAFCGMGNMDRAIQTVKEMQKLRRPTTRTFMPIIHGYAKSGDMRRSLEVFDMRRRCG  
CVPTVHTFNGLINGLVEKRQMEKAVEILD<sup>EMTLAGVSANEHTYTKIMQGYASV</sup>GD<sup>TGKA</sup><sup>AFEYFTR</sup>FEYFTRLQN  
EGLD<sup>VDIFTYEALLKACCKSGRMQSALAVTKEMSARNIPRNSFVYNILIDGWARRGDVWEA</sup>ADLIQQM  
KKEGVK<sup>PDIHTYTSFISACSKAGDMNRATQTIEEMEALGVKPNIKTYTTLIK</sup>GWARASLPEKALSCYEEM  
KAMGIK<sup>PDKAVYHCLLTSLLSRASIAEAYIYSGVMTICKEMVEAGLIVDMGTAVHWSKCLCKIEASGGELT</sup>  
ETLQKT<sup>FPPDWSSHHHHHGLDQVSDVSD</sup>EDD<sup>VDGEDGEDDEDVNSVSDLLSPYK</sup>

ClpC1: MAMATRVLAQSTPPSLACYQRNVPSRGSGRSRRSVKMMCSQLQVSGLRMQGFMGLRGNNALDTLGK  
SRQDFH<sup>SKVRQAMNVPKGKASRFTVKAMFERFTEKAIK</sup>VIMLAQEEARRLGHN<sup>FVGTEQILLGLIGEGTG</sup>  
IAAKVLKSMGINLK<sup>DARVEVEKII</sup>GRGSGFVA<sup>EIPFTPRAKRVLELSLEE</sup>ARQLGHNYIGSEHLLGLLRE  
GEGVAARVLENLGADPSNIRTQVIRMVGENNEVTANVGGGSSSNKMPTLEEYGTNLTKLAE<sup>EGKLDPVV</sup>  
GRQPQIERVVQILGRRTKNNPCLIGEPGVGKTAIAEGLAQRIASGDVPETIEGKKVITLDMGLLVAGTKYR  
GEFEERLKKLMEEIRQSDEILFIDEVHTLIGAGAAEGAIDAANILKPALARGE<sup>LQCIGATTLD</sup>EYRKHIEKDP  
ALERRFQPVKVPEPTVDETIQILKGLRERYEIH<sup>HKLRYTDES</sup>LVA<sup>AAQLSYQYISDRFLPD</sup>KAI<sup>DLIDEAGSR</sup>  
VRLR<sup>HAQVPEEAR</sup>HAQVPEEAR<sup>ELEKELRQITKEKNEAVRGQDFEKAGTLRDREIELRAE</sup>VS<sup>AIQAK</sup>AIQAKGKEMSKA<sup>ESETG</sup>  
EEGPMV<sup>TESDIQHIVSSWTGIPVEKVSTDES</sup>DRLLKMEETLHKRIIGQDEAVKAISRAIRRARVGLKNPNRPI  
ASFIFSGPTGVGKSELAKALAAYYFGSEEAMIRLDMSEFMERHTVSKLIGSPPGYVGYTEGGQLTEAVRRR  
PYTVVL<sup>FDEIEKAHPDVFN</sup>MMLQILEDGRLTDSKGRTVDFKNTLLIMTSNVGSSVIEKGRRIGFDLDYDEK  
DSSYNRIKSLVTEELKQYFRPEFLNRLDEMIVFRQLTKLEVKEIADILLKEVFERLKKKEIELQVTERFKERVV  
DEGYNPSYGARPLRRAIMRLLED<sup>SMAEKMLAREIKEGDSVIVDVDAEGNVTVL</sup>NGSGTPTTSLEE<sup>QEDS</sup>  
LPVA

Abb. A5: Aminosäuresequenz der in Bande 1 (Abb. E16A) durch Koimmunpräzipitation mit  $\alpha$ -WHIRLY3 gefundenen Proteine. Grün sind die plastidären Importsequenzen dargestellt. Die massenspektrometrisch bestimmten Peptide sind in lila gezeigt.



**PRPS5:** MATASALSSSLSLHTRTSSLISSSSTKSIVSFSSFLNRRFSSSLTVKASSTDTETIFFEDETPEITANVVFDPPI  
 APEGFVSPPYFDEGSDETEEEIATAFEELYGPAYSGESMLGKDIYVMDSKHKSSGIGGPKPKDKIRDGFEEER  
 VVQVRRVTKVVGKGKQLKFRIVVVGDKQGNVGVCAKAKEVVAVQKSAIDARRNIVQVPMTKYSTFPHR  
 SEG DYGA AKV MLR PASPGT GVIAGGAVR ILE MAGVENALGKQLGSNNALNNARATLA AVQ QMRQFRDVAQ  
 ERGIPMEELWK

**PTAC4 /VIPP1:** MALKASPV TGLFPPLRPTASSPSTSSNRPCSLRILPLRTSFFGNSSGALRVNVLRLACDNRLRCNGHGATMN  
 LFERFSRVVKS YANALISSFEDPEK ILEQT VIE MNSDLTKMRQATAQVLASQKQLQNKYAAQSSDDWYKRA  
 QLALAKGDEDLAREALKRRKSFADNATALKTQLDQQKG VVDNLVSNTRLLESKIQEAKAKKDTLLARARTAKTA  
 TKVQEMIGTVNTSGALSAFEKMEEKVMAMESEADALTQIGTDELEGKFQMLETSSVDDDLADLKKELSGSSKK  
 GELPPGRSTVAASTRYPFKDSEIENELNELRRKANDF

**BCC1:** MASSSF SVTSPAAAASVYAVTQTSSHFIQNR SRRVSFRLSAKPKLRFLSKPSRSSYPVVK AQSNKVSTGASSN  
 AAKVDGPSSAEGKEKNSLKESSASSPELATEESIFE LTVKLVD SRDVELQLKQLDCEL VIRKKEALPQP  
 QAPASYVM MQPNQPSYAQQMAPPAAPAAAAPAPSTPASLPPSPPTPAKSSLPTVKSPMAGTFYRSPAPGEP  
 PFIK  
 PFIKVGDKVQKGQVLCIVEAMKLMNEIESDHTGTVDIVAEDGKPVSLDTPLFVVQP

Abb. A6: Aminosäuresequenz der in Bande 3 (Abb. E16A) durch Koimmunpräzipitation mit  $\alpha$ -WHIRLY3 gefundenen Proteine. Grün sind die plastidären Importsequenzen dargestellt. Die massenspektrometrisch bestimmten Peptide sind in lila gezeigt.

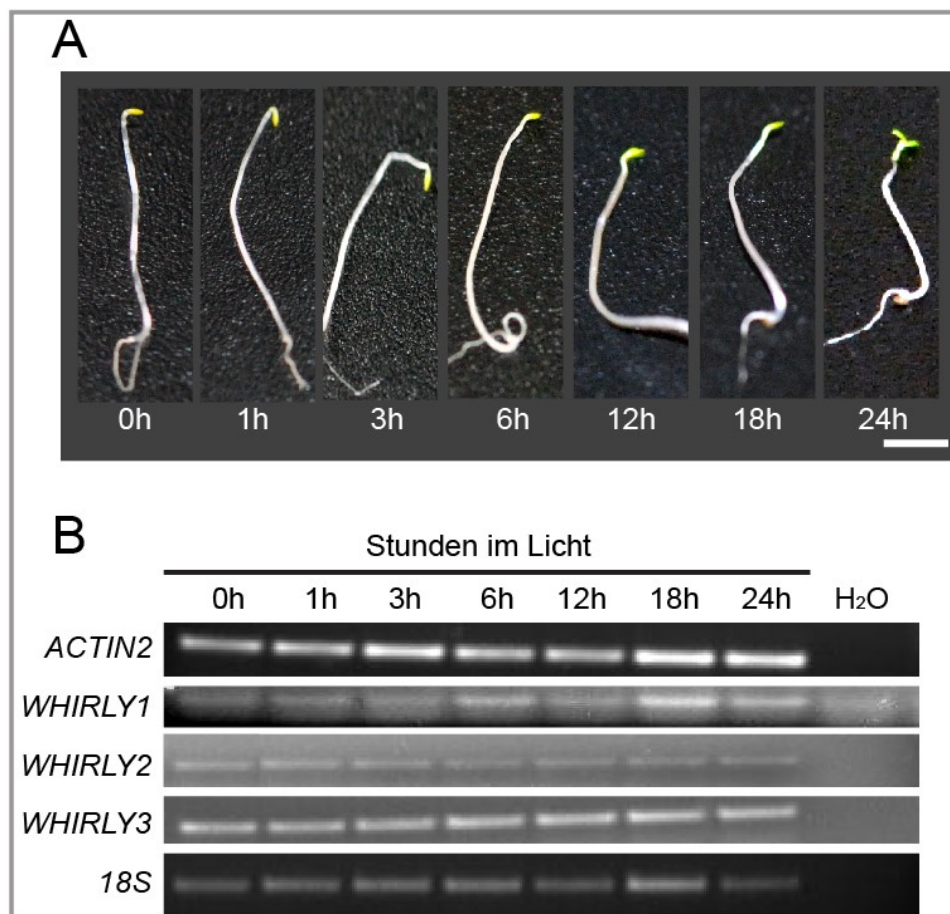
**FIB1a:** MATVPLFTQFPCKTLNPSSSNTKHQSKSPILLPINSINRRSEIGVSVHRPDFKIRATDIDDEWGQDGERVFA  
 SSSTVSADKAIESVEETERLKRSLADSLYGTDRGLSVSSDTRAEISELITQLESKNPTAPNEALFLLNGKW  
 ILAYTSFVGLFPLLSRRIEPLVKVDEISQITSDSFTVQNSVRFAGPFSTTSFSTNAKFEIRSPKRVQIKFEQGV  
 IGTPQLTDSIEIPESVEVLGQKIDLNP IKG LLSVQDTASSVAR  
 ISRGDGGSVYVLIKEGSSLLNP

**PetA:** MQTRNTFSWIREITRSISVSLIYITWASISSAYPIFAQQNYENPREATGRIVCANCHLANKPVDIEVPQTVLPD  
 TVFEAVVKIPYDMQLKQVLANGKKGALNVGAVLILPEGFELAPPDRISPEMKEKIGNLSFQNYRPNKKNILVIGP  
 VPGQK  
 TIVDASNGREVIDIIPRGLLELVSEGESIKLDQPLTSNPNVGGFGQGD AEIVLQDPLRVQGLLFFLGSVVLAQIFL  
 VLKKKQFEKVQLSEMNF

**FIB4:** MATSSTFSSLLPSPALLSDHRSPPPSIRYSFSPLTPKSSRLGFTVPEKRNLAANSSLVEVSIGGESDPPSSS  
 GSGGDDKQIALLKLKLSVVSGLNRGLVASVDDLERA EVAAKELETAGGPVLTDDLDKLQGWRLLYSSAFSS  
 R  
 TVKTSGNLSQIPFDIPRLPDSFRPSSNPGTGDFEVTYVDDTMRITRGDRGELRVFVIA

Abb. A7: Aminosäuresequenz der in Bande 4 (Abb. E16A) durch Koimmunpräzipitation mit  $\alpha$ -WHIRLY3 gefundenen Proteine. Grün sind die plastidären Importsequenzen dargestellt. Die massenspektrometrisch bestimmten Peptide sind in lila gezeigt.

PRPS3: MGQKINPLGRLGTTQSHSLWFAQPKKYSEGLEEDKKIRDCAIKNYVQKNIRISSGMEGIARIEIQKRDLIQIII  
 YMGFPKLLIEDKPRRVEELQMNVQKELNCVNRKLNIAITRISNPYGDPNILAEFIAGQLKNRVSRKAMKKAIE  
 LTEQANTKGIQVQIAGRIDGKEIARVEWIREGRVPLQTIEAKIDYCSYTVRTIYGVLGIKIWIFVDEE





## 7.6 Empfindlichkeit von Rosettenblättern gegenüber Salicylsäure bzw. Abscisinsäure

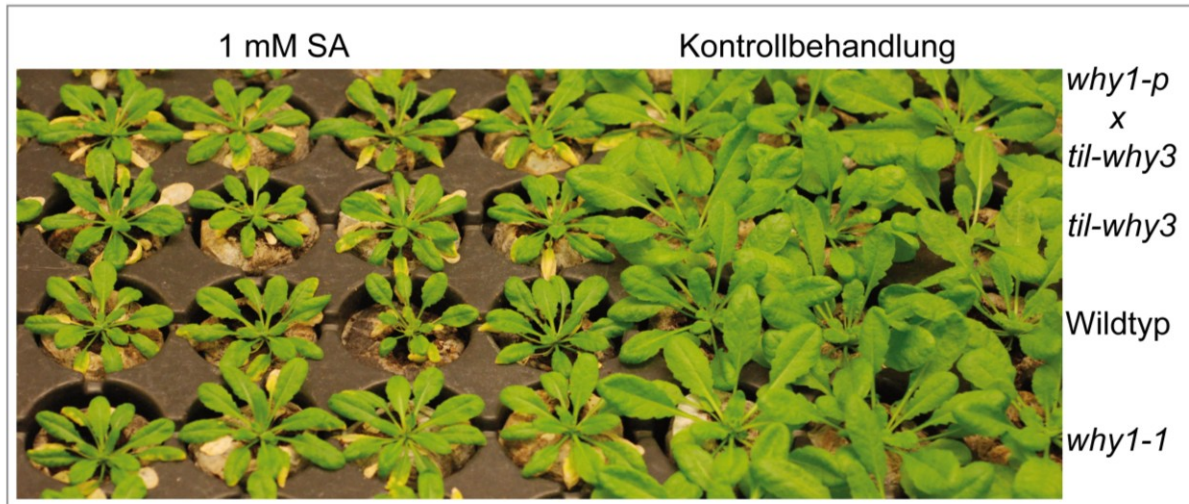


Abb. A10: Effekte von Salicylsäure (SA) auf Rosettenblätter. Vier Wochen alte Pflanzen der Mutanten *why1-p x til-why3*, *til-why3* und *why1-1* und des Wildtyps wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen täglich mit einer SA-Lösung (1 mM SA + 0,01% Tween) behandelt. Kontrollpflanzen wurden mit einer Lösung ohne SA besprüht (Kontrollbehandlung).

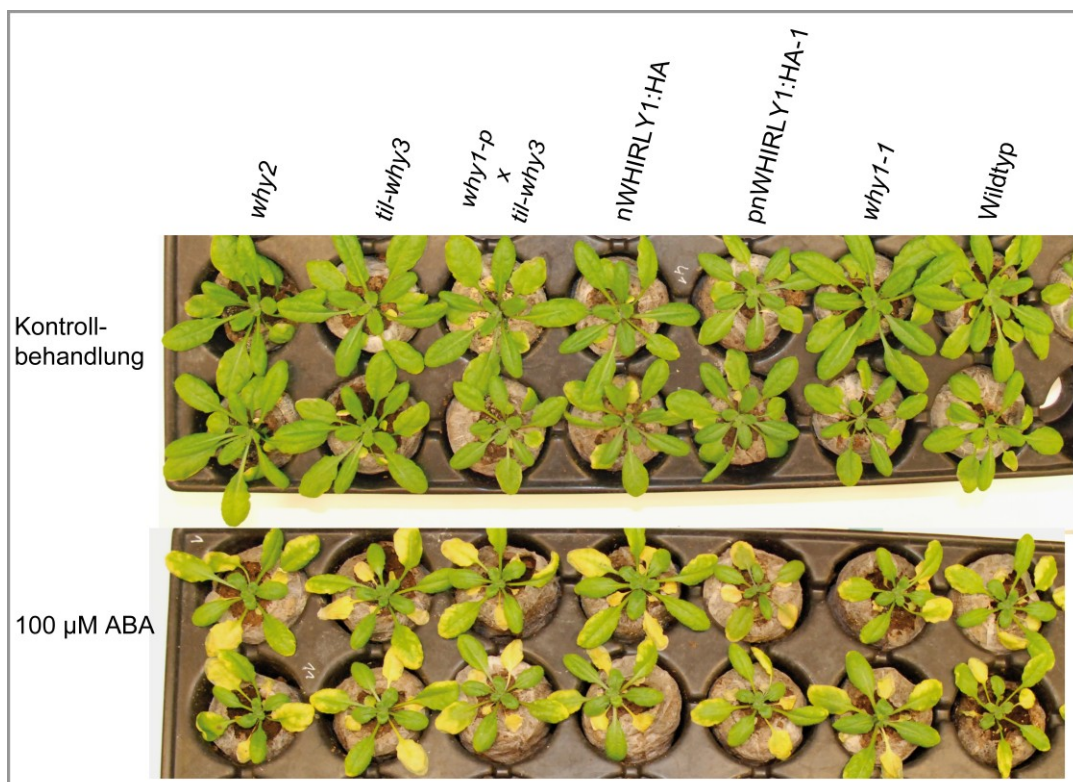


Abb. A11: Einfluss von Abscisinsäure (ABA) auf Rosettenblätter. Die Mutanten *why2*, *til-why3*, *why1-p x til-why3* und *why1-1* sowie die transgenen Linien *nWHIRLY1:HA* und *pnWHIRLY1:HA-1* und der Wildtyp wurden über einen Zeitraum von drei Tage täglich mit einer ABA-Lösung (100 µM ABA + 0,01% Tween) behandelt. Kontrollpflanzen wurden mit einer Lösung ohne ABA besprüht (Kontrollbehandlung).

## 7.7 Effekte von Norflurazon

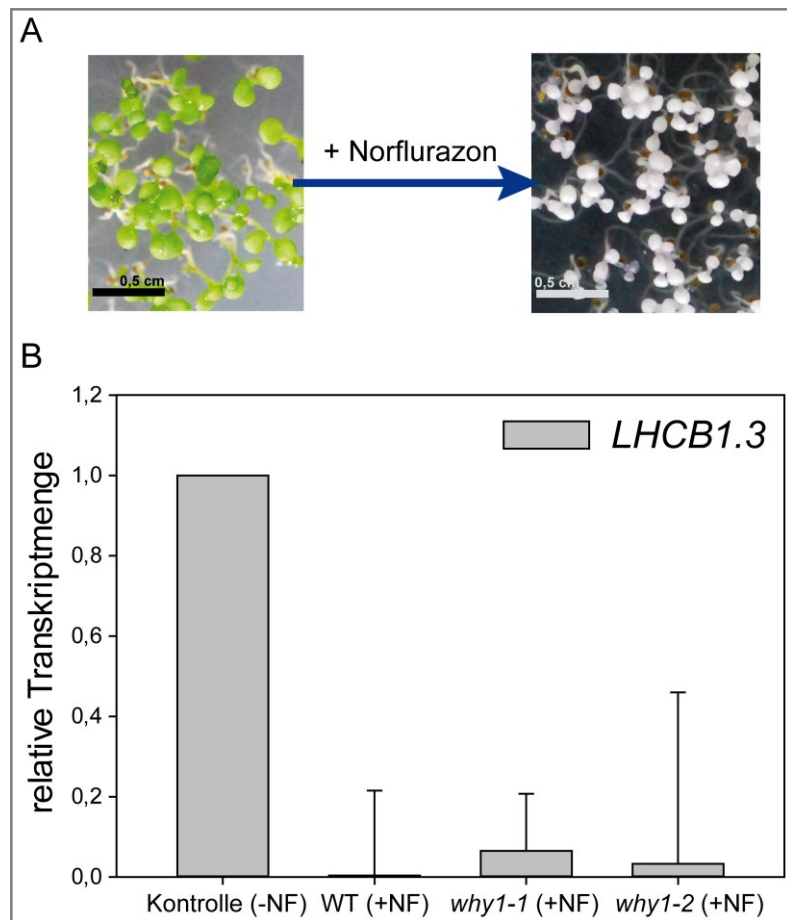


Abb. A12: Einfluss von Norflurazon auf die Entwicklung von Keimlingen von *A. thaliana*. **A** Samen wurden bei 100  $\mu$ E im Dauerlicht für sechs Tage auf MS-Medium kultiviert, dem entweder kein Inhibitor (links) oder 5  $\mu$ M Norflurazon (rechts) zugesetzt waren. **B** Die Transkriptmengen des Gens *LHCb1.3* in den mit Norflurazon (+NF) behandelten Keimlingen der Linien *why1-1* und *why1-2* sowie des Wildtyps wurden mittels quantitativer *Real-Time* PCR mit der Transkriptmenge in den entsprechenden unbehandelten Keimlingen verglichen. Als Kontrollgen wurde *ACTIN2* genutzt. Die Transkriptmengen in den unbehandelten Keimlingen sind auf den Wert 1 normiert und sind nur einmal abgebildet (Kontrolle (-NF)). Die Transkriptmengen in den behandelten Keimlingen beziehen sich jeweils auf den Wert "Kontrolle (-NF)". Standardabweichungen wurden aus drei technischen Replikaten berechnet.

### 7.8 Expression von *LHCB1.3* und *RBCS* in *why1*-Mutanten

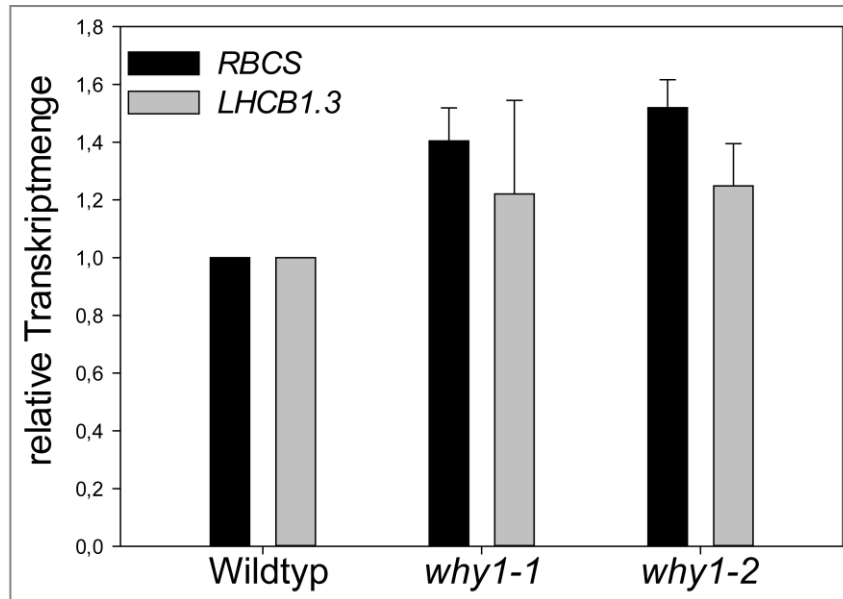


Abb. A13: Die Transkriptmengen der Gene *RBCS* und *LHCB1.3* in sechs Tage alten Keimlingen der *why1-1*- und *why1-2*-Mutanten wurden mittels quantitativer *Real-Time* PCR mit der Expression im Wildtyp verglichen. Als Kontrollgen wurde *ACTIN2* genutzt. Die Transkriptmengen im Wildtyp sind auf den Wert 1 normiert, auf den sich alle weiteren Werte beziehen. Standardabweichungen wurden aus drei technischen Replikaten berechnet.

## 7.9 Effekte von Lincomycin

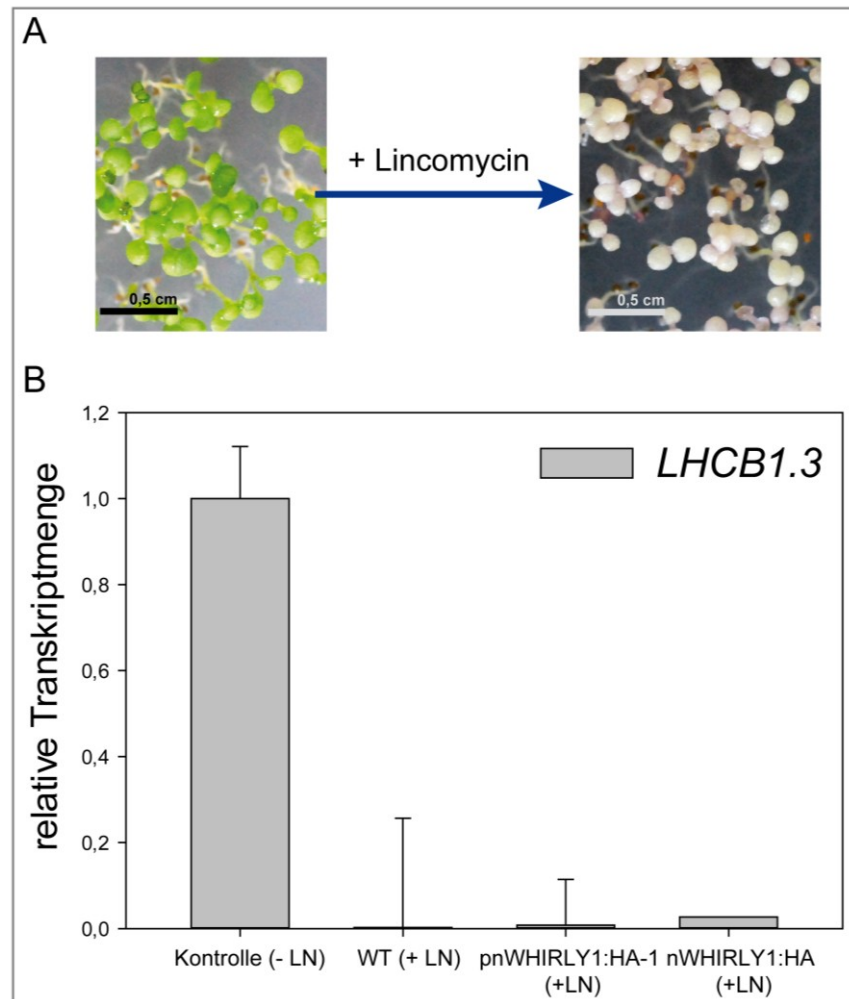


Abb. A14: Einfluss von Lincomycin auf die Entwicklung von Keimlingen von *A. thaliana*. **A** Samen wurden bei 100  $\mu$ E im Dauerlicht für sechs Tage auf MS-Medium kultiviert, dem entweder kein Inhibitor (links) oder 220  $\mu$ g/ml Lincomycin (rechts) zugesetzt waren. **B** Die Transkriptmengen des Gens *LHCb1.3* in den mit Lincomycin (+LN) behandelten Keimlingen der Linien *why1-1* und *why1-2* sowie des Wildtyps wurden mittels quantitativer *Real-Time* PCR mit der Transkriptmenge in den entsprechenden unbehandelten Keimlingen verglichen. Als Kontrollgen wurde *ACTIN2* genutzt. Die Transkriptmengen in den unbehandelten Keimlingen sind auf den Wert 1 normiert und sind nur einmal abgebildet (Kontrolle (-LN)). Die Transkriptmengen in den behandelten Keimlingen beziehen sich jeweils auf den Wert "Kontrolle (-LN)". Standardabweichungen wurden aus drei technischen Replikaten berechnet.

## 7.10 Expression von *LHCB1.3* und *RBCS* in *WHIRLY1*-Überexpressionslinien

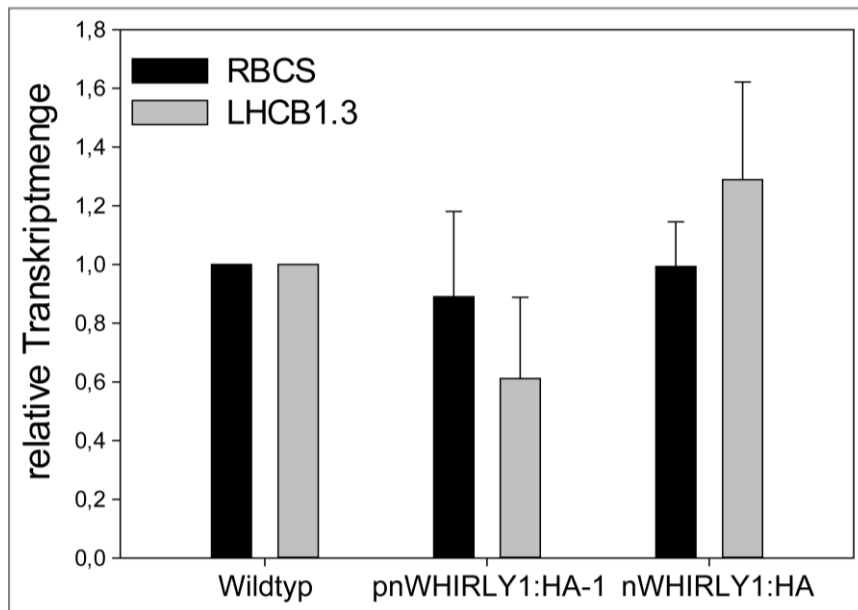


Abb. A15: Die Transkriptmengen der Gene *RBCS* und *LHCB1.3* in sechs Tage alten Keimlingen der Überexpressionslinien, in denen das rekombinante WHIRLY1:HA-Protein entweder in Plastiden und Zellkern (pnWHIRLY1:HA) oder nur im Zellkern (nWHIRLY1:HA) akkumuliert, wurden mittels quantitativer *Real-Time* PCR mit der des Wildtyps verglichen. Als Kontrollgen wurde *ACTIN2* genutzt. Die Transkriptmengen im Wildtyp sind auf den Wert 1 normiert, auf den sich alle weiteren Werte beziehen. Standardabweichungen ergaben sich aus drei technischen Replikaten.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Rena Jutta Irene Isemer  
Geburtsdatum: 30.09.1982  
Geburtsort: Eutin  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Heimatort: Lütjenburg

### Berufserfahrung/Promotion

seit 2008 Promotion an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CAU)  
Betreuung durch Prof. K. Krupinska  
03.2008 - 06.2008 Arbeit am Botanischen Institut der CAU  
2001-2002 Arbeit als Au-pair in Bethesda, Maryland, USA

### Studium

2002-2008 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Studiengang Biologie  
Hauptfach: Botanik  
Nebenfächer: Zellbiologie, Biochemie  
Abschluss: Diplom (Betreuung der Diplomarbeit durch Prof. K. Krupinska)

### Schulausbildung

1993-2001 Hoffmann-von-Fallersleben Schulzentrum in Lütjenburg  
Abschluss: Abitur

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meine Betreuerin – nach Inhalt und Form meine Arbeit ist und unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt wurde. Diese Arbeit wurde bis jetzt weder vollständig noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Teile der Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

Isemer, R., Krause, K., Grabe, N., Kitahata, N., Asami, T., Krupinska, K. (2012b) Plastid located WHIRLY1 enhances the responsiveness of Arabidopsis seedlings toward abscisic acid. *Front Plant Sci.* 3, doi: 10.3389/fpls.2012.00283.

Isemer, R., Mulisch, M., Schäfer, A., Kirchner, S., Koop, H.-U., Krupinska, K. (2012a) Recombinant Whirly1 translocates from transplastomic chloroplasts to the nucleus. *FEBS Lett.* 586, 85-88.

Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen:

Isemer, R., Krause, K., Krupinska, K. (2012) The dual localized protein WHIRLY1 has functions in plastids and the nucleus. *Frontiers in plant biology: from discovery to applications*, Gent, Belgien

Isemer, R., Krause, K., Krupinska, K. (2012) The dual localized protein WHIRLY1 has functions in plastids and the nucleus. *Black Forest Retreat 2012 on Molecular Plant Science*, Herzoghorn

Isemer, R., Braun, S., Krupinska, K. (2011) Subcellular distribution and functions of plastidic Whirly proteins. *Plant Organellar Signaling - from Algae to Higher Plants*, Primosten, Kroatien

Isemer, R., Melonek, J., Zottini, M., Krause, K., Krupinska, K. (2011) Functional characterization of the Whirly protein family in *Arabidopsis thaliana*. *25. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen*, Dabringhausen

Isemer, R., Miao, Y., Krause, K., Krupinska, K. (2010) Are chloroplasts the main regulators of aging? The dual-localized senescence regulator Whirly1 has effects on nuclear and plastid gene expression in Arabidopsis. *XI. Colloquium of the International Society for Endocytobiology and Symbiosis*, Tromsø, Norwegen

Isemer, R., Miao, Y., Krause, K., Krupinska, K. (2010) A twofold switcher: Multiple nuclear and plastid genes are affected by the senescence-associated transcription factor Whirly1 in Arabidopsis. *21st International Conference on Arabidopsis Research*, Yokohama, Japan

Isemer, R., Miao, Y., Zschiesche, W., Humbeck, K., Krupinska, K. (2009) Expression Profiles of whirly Genes during Development of Arabidopsis. *Botanikertagung "Plants for the Future"*, Leipzig

Kiel, den .....

.....

Rena Isemer

## Danksagung

Ich danke...

vor allen anderen Prof. Dr. Karin Krupinska für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe diese Arbeit anzufertigen und die unschätzbar wertvolle Hilfe bei wissenschaftlichen und anderen Problemen. Sie hat mit ihren Ideen, ihrer Erfahrung und durch viele fruchtbare Diskussionen nicht nur diese Arbeit sondern auch meine Entwicklung zur Wissenschaftlerin immer wieder vorangetrieben.

Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop und Stefan Kirchner für die Herstellung der Plasmotransformanten.

Dr. Henrik Aronsson und Nadir Khan für die Hilfe bei der Durchführung der Koimmunpräzipitation und die schöne Zeit in Göteborg.

Dr. Michela Zottini und Dr. Alex Costa für die WHIRLY2:YFP-Linien.

Anke Schäfer für das Anfertigen der Genkassette zur Herstellung der Plasmotransformanten sowie für die Hilfe bei der Durchführung der Southern Blots.

Julien Hollmann für die Unterstützung beim Erstellen des WHIRLY-Stammbaumes.

Dr. Christine Desel und Dr. Kirstin Gutekunst für die unverzichtbare Hilfe beim Schreiben dieser Arbeit. Christine gilt weiterer Dank für die freundliche Unterstützung beim Anfertigen der mikroskopischen Bilder und die schönen wissenschaftlichen und privaten Gespräche in unserem Büro.

den guten Feen Susanne, Anke, Uli und Frau Arndt. Ohne gute Fee gibt es auch im Labor kein Happy-End. Vielen Dank für die unermüdliche Unterstützung und alles, was ihr mir beigebracht habt.

den jetzigen und ehemaligen Weggefährten Mirl, Svenja, Julien, Luca, Wera, Andrea, Susann, Lars, Frauke, Krishka, Evi, Isa, Joanna, Nils, Kathleen, Jon und Kirsten für unsere gemeinsame schöne Zeit und die gute Arbeitsatmosphäre. Alle zukünftigen Kollegen werden sich an euch messen müssen!

meinen fleißigen HiWis Berit, Mirja und Elisabeth für die gute Arbeit.

den geliebten Menschen, die mir Mut, Kraft und Zuversicht gegeben haben und die immer für mich da sind. Meine Mama, Falko, Sonja, Robert und Papa. Ohne euch hätte ich es niemals geschafft!